

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal)



TESIS DOCTORAL

**Estudio morfológico y funcional de un modelo
experimental de cirrosis biliar en ratas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carlos Gutiérrez Ortega

Directora:

Patrocinio Moratinos Palomero

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0747-6

© Carlos Gutiérrez Ortega, 1999

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL, DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS BILIAR EN RATAS



X-53-345290-1

MADRID 8 de julio de 1998

Fdo. Carlos Gutiérrez Ortega



BIBLIOTECA

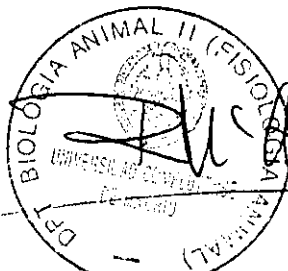
ROSA MARIA ARAHUETES PORTERO, PROFESORA TITULAR Y
DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL II, DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que el presente trabajo del Licenciado D. Carlos Gutiérrez Ortega, presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, titulado Estudio morfológico y funcional, de un modelo experimental de cirrosis biliar en ratas, ha sido realizado bajo mi tutoría. Así mismo considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, lo firmo en Madrid a tres de julio de mil novecientos noventa y ocho.

LA TUTORA DE LA TESIS



Fdo. Rosa María Arahuetes Portero

PATROCINIO MORATINOS PALOMERO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA; JEFE DE LA UNIDAD DE ANATOMÍA PATOLÓGICA EXPERIMENTAL, DEL HOSPITAL MILITAR CENTRAL GÓMEZ ULLA; Y PROFESOR ASOCIADO DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA FACULTAD DE MEDICINA (DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA) DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que el presente trabajo del Licenciado D. Carlos Gutiérrez Ortega, presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, titulado Estudio morfológico y funcional, de un modelo experimental de cirrosis biliar en ratas, ha sido realizado bajo mi dirección. Así mismo considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, lo firmo en Madrid a dos de junio de mil novecientos noventa y ocho.

EL DIRECTOR DE LA TESIS

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke at the end, representing the name Patrocinio Moratinos Palomero.

Fdo. Patrocinio Moratinos Palomero

A M^a Luisa, Carlos y Pablo

Podrán los encantadores mudar nuestra fortuna,
pero el ánimo y el esfuerzo es imposible.
(Puesto en boca de D. Quijote).

Miguel de Cervantes Saavedra

Agradecimientos

A M^a Luisa Hernández-Gil González (Licenciada en Biología), mi mujer, por su paciencia, por su estímulo y por las facilidades derrochadas durante el desarrollo de este tercer ciclo; a Carlos Gutiérrez Salgado (Licenciado en Medicina y Cirugía), mi padre, quien me ha regalado su tiempo, convirtiendo este trabajo, con entusiasmo y esfuerzo, en otro más comprensible; a M^a del Carmen Ortega de Guillerna, mi madre, por su apoyo; a Patrocinio Moratinos Palomero (Doctor en Medicina), director de este estudio, por ofrecerme su experiencia, su incondicional dedicación y sus conocimientos morfológicos; a Rosa M^a Arahuetes Portero (Doctora en Biología), mi tutora, por su buena disposición y consejo; a David Tabanera del Real (Licenciado en Veterinaria), Jefe del Servicio de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital Militar Central Gómez Ulla, y a los que le precedieron, por poner a mi alcance los medios humanos y materiales indispensables para la elaboración de esta tesis; a Fernando Pérez-Iñigo Alonso (Licenciado en Veterinaria) por su ayuda en las técnicas colangiográficas y la digitalización informática de imágenes; a Manuel Meilan Teijeiro por procurarme los medios que he precisado; a Timoteo Martínez López, Angel Aguilera Martínez y Manuel Rivera Puertas (Licenciados en Veterinaria), Jefes de la Sección a la que pertenezco, por las facilidades que me han proporcionado; a Jerónimo Carnés Sánchez (Licenciado en Biología), por su ayuda ilimitada y por su ejemplo de constancia en el trabajo; a mis compañeros Jesús Díaz Regañón (Licenciado en Veterinaria), Pablo Hernández Garzón (Licenciado en Veterinaria), Félix Mellado Robledo (Auxiliar de Veterinaria), Pablo Ruiz Hernández (Auxiliar de Veterinaria), Antonio Sánchez (Auxiliar de Veterinaria), M^a Jesús Hernández, Rafael Fernández, y Víctor Marrupe, por allanar, cada uno desde su puesto, la tarea que me propuse; al Personal del Laboratorio Central de Análisis Clínicos por las determinaciones bioquímicas que tan amablemente realizaron; al Personal del Servicio de Anatomía Patológica por la inmejorable preparación de las piezas histológicas.

A todos, gracias.

I. INTRODUCCIÓN	2
I.1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	2
I.2. ANATOMÍA HEPÁTICA DE LA RATA	2
I.3. LA OBSTRUCCIÓN BILIAR COMO PROCESO PATOLÓGICO	3
I.4. CIRROSIS HEPÁTICA: GENERALIDADES, TIPOS MORFOLÓGICOS Y FRECUENCIA	3
I.4.1. <i>Cirrosis biliar</i>	4
I.4.1.1. Cirrosis biliar primaria	5
I.4.1.2. Cirrosis biliar secundaria	5
I.5. MODELOS EXPERIMENTALES DE CIRROSIS	6
I.5.1. <i>Empleo de hepatotoxinas</i>	6
I.5.1.1. El tetracloruro de carbono	6
I.5.1.2. Hepatocarcinógenos	7
I.5.1.3. Alcohol etílico	7
I.5.2. <i>Alteración del estado nutricional</i>	8
I.5.2.1. Dieta baja en proteínas y colina y rica en grasas	8
I.5.2.2. Dieta con etionina	8
I.5.3. <i>Interferencia sobre la respuesta inmunológica</i>	8
I.5.3.1. Suero heterólogo	8
I.5.3.2. Productos procedentes de la pared celular bacteriana	8
I.5.3.3. Endotoxina	8
I.5.4. <i>Inducción genética</i>	9
I.5.5. <i>Obstrucción del árbol biliar</i>	9
II. INTERROGANTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....	11
II.1. INTERROGANTES	11
II.2. HIPÓTESIS	11
II.2.1. <i>Hipótesis conceptual</i>	11
II.2.2. <i>Hipótesis estadísticas</i>	11
II.3. OBJETIVOS	11
III. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	13
III.1. MATERIAL	13
III.1.1. <i>Instalaciones</i>	13
III.1.2. <i>Animales</i>	13
III.1.2.1. Características	13
III.1.2.2. Estabulación	13
III.1.2.3. Alimentación	13
III.1.2.4. Condiciones del bioterio	13
III.1.3. <i>Material quirúrgico</i>	14
III.1.4. <i>Material fungible</i>	14
III.1.5. <i>Instrumental para las determinaciones de laboratorio</i>	14
III.1.5.1. Determinación del valor hematocrito	14
III.1.5.2. Determinaciones bioquímicas séricas	14
III.1.5.3. Proteinogramas	14
III.1.5.4. Actividad de protrombina	14
III.1.6. <i>Material para los estudios histológicos</i>	14
III.1.7. <i>Material para la realización del estudio colangiográfico</i>	14

III.1.8. Material para el proceso informático de datos	15
III.2. MÉTODO.....	16
III.2.1. Ligadura del conducto biliar común.....	16
III.2.1.1. Preoperatorio	16
III.2.1.2. Anestesia.....	16
III.2.1.3. Abordaje quirúrgico, ligadura y sección del conducto biliar común ..	16
III.2.1.4. Reanimación.....	16
III.2.1.5. Cuidados postoperatorios.....	16
III.2.2. Preparación de las distintas series de animales.....	16
III.2.2.1. Serie de control.....	16
III.2.2.2. Serie de operación simulada	17
III.2.2.3. Serie de supervivencia	17
III.2.2.4. Serie de evolución patológica	17
III.2.3. Exanguinación intracardiaca	17
III.2.3.1. Determinaciones analíticas en sangre	18
III.2.3.1.1. Determinación del valor hematocrito.....	18
III.2.3.1.2. Actividad de protrombina.....	18
III.2.3.1.3. Determinaciones bioquímicas séricas.....	18
III.2.3.1.3.1. Enzimas.....	18
III.2.3.1.3.2. Sustratos metabólicos.....	19
III.2.3.1.3.3. Concentraciones iónicas	19
III.2.3.1.4. Proteinograma	19
III.2.4. Necropsias	19
III.2.5. Estudio anatomopatológico.....	19
III.2.5.1. Macroscópico	19
III.2.5.2. Microscópico	19
III.2.6. Método estadístico	20
III.2.6.1. Estudio de supervivencia	20
III.2.6.1.1. Variables.....	20
III.2.6.1.2. Tabulación de resultados: matriz de datos	20
III.2.6.1.3. Índices descriptivos para valoración de variables	20
III.2.6.1.4. Representación gráfica	20
III.2.6.1.5. Técnica estadística para comparación de variables.....	21
III.2.6.2. Ensayo clínico —estudio de evolución patológica—.....	21
III.2.6.2.1. Variables.....	21
III.2.6.2.2. Índices descriptivos para valoración de variables.....	21
III.2.6.2.3. Representación gráfica.....	21
III.2.6.2.5. Técnicas estadísticas para comparación de variables	21
III.2.7. Cronograma.....	22
IV. EXPOSICION DE RESULTADOS.....	23
IV.1. SERIE DE CONTROL	23
IV.1.1. Constantes sanguíneas.....	23
IV.1.1.1. Constantes bioquímicas séricas.....	23
IV.1.1.1.1. Constantes enzimáticas	23
IV.1.1.1.2. Sustratos metabólicos	23
IV.1.1.1.3. Constantes iónicas	24
IV.1.1.1.4. Proteinograma	24
IV.1.1.2. Constantes hematológicas	24

IV.1.1.2.1. Actividad de protrombina	24
IV.1.1.2.2. Valor hematocrito	25
<i>IV. 1.2. Contenido biliar en el conducto colédoco</i>	<i>25</i>
IV.2. SERIE DE OPERACIÓN SIMULADA	26
<i>IV.2.1. Determinaciones analíticas en sangre</i>	<i>26</i>
IV.2.1.1. Valor hematocrito	26
IV.2.1.2. Actividad de la protrombina	26
IV.2.1.3. Bioquímica sérica	27
IV.2.1.3.1. Actividades enzimáticas	27
IV.2.1.3.2. Sustratos metabólicos	28
IV.2.1.3.3. Constantes iónicas	32
IV.2.1.4. Proteinograma	33
IV.3. SERIE DE SUPERVIVENCIA	36
<i>IV.3.1. Estudio de supervivencia</i>	<i>36</i>
IV.3.1.1. Matriz de datos	36
IV.3.1.1.1. Representación gráfica de la matriz de datos	37
IV.3.1.2. Tabla de vida (método actuarial)	37
IV.3.1.3. Curva de supervivencia	41
<i>IV.3.2. Estudio de las 13 ratas supervivientes</i>	<i>41</i>
IV.3.2.1. Estudio colangiográfico	42
IV.3.2.2. Estudio morfológico del hígado y del colédoco de las ratas supervivientes	42
IV.3.2.2.1. Observaciones macroscópicas	42
IV.3.2.2.2. Observaciones microscópicas	42
IV.4. SERIE DE EVOLUCIÓN PATOLÓGICA	45
<i>IV.4.1. Estudio morfológico</i>	<i>45</i>
IV.4.1.1. Hígado	45
IV.4.1.1.1. Observaciones macroscópicas	45
IV.4.1.1.2. Observaciones microscópicas	45
IV.4.1.1.2.1. Proliferación de ductos biliares	48
IV.4.1.1.2.2. Fibrosis periductal e intralobulillar	49
IV.4.1.1.2.3. Cirrosis	52
IV.4.1.1.2.4. Infiltrado inflamatorio periductal y portal	53
IV.4.1.1.2.5. Proliferación de fibroblastos	57
IV.4.1.1.2.6. Edema portal y hepatocitario	58
IV.4.1.1.2.7. Binucleación hepatocitaria	59
IV.4.1.1.2.8. Vacuolización nuclear hepatocitaria	60
IV.4.1.1.2.9. Necrosis hepatocitaria	61
IV.4.1.1.2.10. Proliferación de células de Von Kupffer	64
IV.4.1.1.2.11. Estructura lobulillar	65
IV.4.1.2. Colédoco	65
IV.4.1.2.1. Examen macroscópico	65
IV.4.1.2.2. Examen microscópico	65
IV.4.1.2.3. Contenido biliar	66
IV.4.1.2.3.1. Examen macroscópico del contenido biliar	66
IV.4.1.2.3.2. Examen microscópico del contenido biliar	69
IV.4.1.3. Bazo	69
IV.4.1.3.1. Observaciones macroscópicas	69
IV.4.1.3.2. Observaciones microscópicas	69

IV.4.1.4. Riñones.....	69
IV.4.1.4.1. Observaciones macroscópicas.....	69
IV.4.1.4.2. Observaciones microscópicas.....	69
IV.4.1.5. Pulmones.....	71
IV.4.1.5.1. Observaciones macroscópicas.....	71
IV.4.1.5.2. Observaciones microscópicas.....	71
IV.4.1.6. Derrames hemáticos: peritoneales, torácicos y en luz intestinal.....	73
IV.4.2. Constantes sanguíneas.....	77
IV.4.2.1. Bioquímica sérica.....	77
IV.4.2.1.1. Alteraciones enzimáticas.....	77
IV.4.2.1.1.1. Creatin fosfo kinasa (CPK).....	77
IV.4.2.1.1.2. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT).....	78
IV.4.2.1.1.3. Aspártico transaminasa (AST).....	79
IV.4.2.1.1.4. Alanin transaminasa (ALT).....	80
IV.4.2.1.1.5. Láctico deshidrogenasa (LDH).....	82
IV.4.2.1.1.6. Fosfatasa alcalina (AP).....	83
IV.4.2.1.2. Alteración de los sustratos metabólicos.....	84
IV.4.2.1.2.1. Albúmina (ALB).....	84
IV.4.2.1.2.2. Proteínas totales (PROT).....	85
IV.4.2.1.2.3. Bilirrubina total (TBIL).....	86
IV.4.2.1.2.4. Bilirrubina directa (DBIL).....	87
IV.4.2.1.2.5. Creatinina (CREA).....	88
IV.4.2.1.2.6. Urea (UREA).....	89
IV.4.2.1.2.7. Glucosa (GLU).....	90
IV.4.2.1.2.8. Colesterol (CHOL).....	91
IV.4.2.1.2.9. Triglicéridos (TRIG).....	92
IV.4.2.1.2.10. Ácido úrico (UA).....	93
IV.4.2.1.3. Constantes iónicas.....	94
IV.4.2.1.3.1. Calcio (Ca^{++}).....	94
IV.4.2.1.3.2. Hierro (Fe^{++}).....	95
IV.4.2.1.3.3. Sodio (Na^{+}).....	96
IV.4.2.1.3.4. Potasio (K^{+}).....	97
IV.4.2.1.4. Proteinograma.....	98
IV.4.2.1.4.1. Albúmina sérica.....	98
IV.4.2.1.4.2. α_1 - globulinas.....	100
IV.4.2.1.4.3. α_2 - globulinas.....	101
IV.4.2.1.4.4. β - globulinas.....	102
IV.4.2.1.4.5. γ - globulinas.....	103
IV.4.2.2. Alteraciones hematológicas.....	104
IV.4.2.2.1. Actividad de protrombina.....	104
IV.4.2.2.2. Valor hematocrito.....	105
V. DISCUSIÓN.....	107
V.1. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA.....	107
V.2. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	111
V.2.1. Hígado.....	111
V.2.1.1. Observaciones macroscópicas.....	111
V.2.1.2. Observaciones microscópicas.....	111
V.2.1.2.1. Proliferación de ductos biliares.....	111

V.2.1.2.2. Fibrosis periductal e intralobulillar	112
V.2.1.2.3. Cirrosis	112
V.2.1.2.4. Infiltrado inflamatorio periductal y portal	113
V.2.1.2.5. Proliferación de fibroblastos	114
V.2.1.2.6. Edema portal y hepatocitario	115
V.2.1.2.7. Binucleación hepatocitaria	115
V.2.1.2.8. Vacuolización nuclear hepatocitaria	115
V.2.1.2.9. Necrosis hepatocitaria	115
V.2.1.2.10. Proliferación de células de Von Kupffer	116
V.2.1.2.11. Estructura lobulillar	116
V.2.2. <i>Colédoco</i>	116
V.2.2.1. Examen macroscópico	116
V.2.2.2. Examen microscópico	117
V.2.2.3. Contenido biliar	117
V.2.2.3.1. Examen macroscópico del contenido biliar	117
V.2.2.3.2. Examen microscópico del contenido biliar	117
V.2.3. <i>Bazo</i>	117
V.2.4. <i>Riñones</i>	118
V.2.5. <i>Pulmones</i>	118
V.2.6. <i>Derrames hemáticos: peritoneales, torácicos y en la luz intestinal</i>	119
V.3. ESTUDIO FUNCIONAL	120
V.3.1. <i>Bioquímica sérica</i>	120
V.3.1.1. Alteraciones enzimáticas	120
V.3.1.1.1. Creatin fosfo kinasa (CPK)	120
V.3.1.1.2. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)	120
V.3.1.1.3. Transaminasas	121
V.3.1.1.3.1. Aspártico transaminasa (AST)	121
V.3.1.1.3.2. Alanin transaminasa (ALT)	121
V.3.1.1.4. Láctico deshidrogenasa (LDH)	123
V.3.1.1.5. Fosfatasa alcalina (AP)	123
V.3.1.2. Alteración de los sustratos metabólicos	124
V.3.1.2.1. Proteínas séricas totales	124
V.3.1.2.2. Bilirrubinas total (TBIL) y directa (DBIL)	126
V.3.1.2.3. Creatinina (CREA)	127
V.3.1.2.6. Urea (UREA)	127
V.3.1.2.7. Glucosa (GLU)	128
V.3.1.2.8. Lípidos séricos: colesterol (CHOL) y triglicéridos (TRIG)	128
V.3.1.2.9. Ácido úrico (UA)	129
V.3.1.3. Constantes iónicas	129
V.3.1.3.1. Calcio (Ca^{++})	129
V.3.1.3.2. Hierro (Fe^{n+})	129
V.3.1.3.3. Sodio (Na^{+})	130
V.3.1.3.4. Potasio (K^{+})	130
V.3.1.4. Alteraciones hematológicas	130
V.3.1.4.1. Actividad o tiempo de protrombina (TP)	130
V.3.1.4.2. Valor hematocrito (Hto)	131
VI. CONCLUSIONES	132

VII. BIBLIOGRAFIA.....	133
-------------------------------	------------

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Justificación del trabajo

La cirrosis es una de las afecciones más frecuentes y de mayor morbi-mortalidad en la especie humana. Terris M, en 1967¹, calculó que en E.E.U.U. y durante 1964, fue la 5ª causa de muerte en varones de 25 a 64 años de edad. Posteriormente, Galambos JT, en 1979², también en E.E.U.U., la consideró como la 4ª causa de muerte en adultos y la 3ª en varones de 35 a 45 años.

Estudios epidemiológicos de 1986 ponen de manifiesto cómo este proceso patológico representa la 8ª causa de muerte en España, con una tasa de mortalidad del 20,5% (Vargas V, 1997³).

En 1975, Selbach WK⁴, estimó a la cirrosis de etiología alcohólica, como la de mayor porcentaje mundial de cirrosis, alcanzando del 36% al 60% del total de los procesos cirróticos. En España se considera que el alcohol es responsable del 60 al 70% de los casos (Vargas V, 1997³).

Actualmente, el pronóstico de la cirrosis, en general es semejante al del cáncer.

En Suecia, Hallen *et al* (1963⁵), comprobaron que menos de la mitad de los pacientes sobrevivieron un año después del diagnóstico y solamente una décima parte lo hizo después de 10 años. No obstante, el pronóstico de la enfermedad varía dependiendo de que el paciente la presente en forma compensada, no complicada, o en fase descompensada —etapa en la que aparecen una o varias complicaciones importantes como hemorragia digestiva alta, ascitis, encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal, carcinoma hepatocelular o peritonitis espontánea—.

Ginés P *et al* (1987⁶) comprobaron que en los pacientes de cirrosis hepática en forma compensada y una vez determinado el diagnóstico, el 42% permanecía en esta situación hasta 10 años, sobreviviendo algo menos de la mitad (47%) a este período de tiempo. Serra MA *et al* (1982⁷), y Dámico G *et al* (1986⁸), observaron que del 58% al 65% de cirrosis diagnosticadas durante estos años, estaban, por una u otra razón, en forma descompensada; la supervivencia a los 5 años fue, del 16% al 21%.

En el boletín de 1994, de la Organización Mundial de la Salud, se recoge que la probabilidad de que la muerte de una persona esté causada por la cirrosis hepática es de un 1% para el hombre y un 0,4% para la mujer, todos ellos con edades comprendidas entre los 15 y los 60 años. En la misma publicación se estima que, durante 1990 ha provocado el fallecimiento de 97.400 hombres y 48.800 mujeres, de todas las edades y en todo el mundo.

Es importante significar que el curso de esta enfermedad es totalmente irreversible; por ello el mejor tratamiento es la prevención. La corrección de las complicaciones que se puedan producir a posteriori, es, tan solo, de orden sintomático y paliativo; la única terapia definitiva sería, en la actualidad, el transplante.

Debido a su pronóstico, a las posibles complicaciones, a la ausencia de una terapia eficaz, etcétera, se han desarrollado numerosos modelos experimentales en animales tratando de reproducir las características de la enfermedad en el hombre, lo más fielmente posible.

I.2. Anatomía hepática de la rata

El hígado de la rata, que constituye el 4,15% del peso corporal de la misma, está dividido en 4 lóbulos bien diferenciados: el mediano o lóbulo cístico, que posee una

fisura profunda; el lóbulo lateral derecho, que se encuentra parcialmente dividido en los lóbulos: craneal y caudal; un gran lóbulo izquierdo; y un lóbulo caudal de pequeño tamaño, que se encuentra rodeando al esófago (Sheldon W *et al*, 1979⁹).

Es importante poner de manifiesto que:

- La proporción del hígado es tanto mayor con relación a la superficie cuanto mayor es el animal; y es tanto mayor con relación al peso cuanto más pequeño es el animal.
- En una misma especie animal, el peso del hígado es sensiblemente proporcional a la superficie del cuerpo, sin duda a causa de su función termogénica (Testut L *et al*, 1988¹⁰).

En cuanto a la estructura general del lobulillo hepático, es semejante a la de la especie humana.

La rata no posee vesícula biliar, siendo sustituida por los propios conductos biliares que son grandes y distensibles, aunque, ante la ausencia de tono del esfínter de Oddi, se produce un flujo casi continuo de bilis al duodeno, excluyéndose cualquier posibilidad de almacenamiento de la misma (Hebel R *et al*, 1976¹¹).

Los conductos biliares confluyen en el área portal para formar el conducto hepático común o conducto colédoco. Su longitud es de 12 a 45 mm (dependiendo del peso corporal de la rata) y el diámetro medio de 1 mm. Desemboca en la parte dorsal del duodeno, a 20-25 mm del esfínter pilórico. Es importante señalar que, el conducto pancreático común confluye en el colédoco a 1 mm, aproximadamente, de la papila duodenal.

El conducto hepático común esta revestido en su luz por mucosa con un epitelio columnar simple. En su parte distal existen invaginaciones de la misma a modo de criptas. La mucosa esta rodeada por tejido conectivo, que contiene fibras musculares dispersas.

1.3. La obstrucción biliar como proceso patológico

La colestasis crónica, presenta como causas diversos procesos nosológicos de gravedad, entre los que destacan: la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la colestasis crónica infantil o juvenil, la atresia biliar extrahepática y la cirrosis biliar secundaria (Farreras *et al*, 1996¹²).

La detención del flujo biliar determina numerosas lesiones secundarias en el parénquima hepático, destacando la proliferación de conductos biliares y el desarrollo progresivo de fibrosis portal que culmina en la cirrosis biliar secundaria. Así pues, la evolución ulterior de los casos no tratados o tratados sin éxito es dramática. Se suman los efectos de la colestasis crónica, de la malabsorción de grasas y del desarrollo de cirrosis. El tiempo requerido para el progreso de las lesiones varía ampliamente de un caso a otro (Van Eyken P *et al*, 1992¹³).

El tratamiento de la enfermedad es quirúrgico, tratando de corregir la interrupción del flujo biliar. Si ésto fracasara, solo cabría recurrir al transplante hepático, cuyo éxito al año de efectuarse es del 80% (Farreras *et al*, 1996¹²).

1.4. Cirrosis hepática: generalidades, tipos morfológicos y frecuencia

Se caracteriza, a grandes rasgos, por destrucción de las células hepáticas, acompañada de nódulos de regeneración hepatocitaria, y de aumento del tejido conectivo. Estas alteraciones provocan una desorganización difusa de la estructura lobulillar y vascular hepáticas (Conn HO *et al*, 1987¹⁴).

En la cirrosis, la organización lobulillar, la vasculo-macroscópica, y la

microcirculación, quedan incluidas en una red fibrosa que rodea a los nódulos de hepatocitos procedentes del proceso regenerativo (Popper H *et al*, 1970¹⁵).

Desde el punto de vista morfológico, y atendiendo al tamaño de los nódulos, las cirrosis se clasifican en (Anthony PP *et al*, 1978¹⁶; Ludeña de la Cruz MD, 1990¹⁷):

- cirrosis micronodular. Los nódulos de regeneración son pequeños, de tamaño bastante homogéneo parecido al de un lobulillo hepático normal y no contienen elementos portales. Las bandas conectivas que los separan suelen ser gruesas y presentan infiltrado inflamatorio en dependencia con el grado de actividad del proceso. Macroscópicamente, el hígado muestra la superficie uniformemente irregular, sembrado de pequeños nódulos que se extienden de modo difuso por todo el órgano.
- cirrosis macronodular. Tanto el tamaño de los nódulos como la amplitud de las bandas fibrosas varían de un lugar a otro. Los nódulos pueden contener en su interior estructuras portales mejor o peor conservadas. Las células hepáticas, de tamaño y núcleo a menudo grandes, se disponen en forma de nódulos o constituyendo trabéculas de varias células de espesor, lo que indica cambios regenerativos. Las bandas conectivas pueden adoptar la forma de finos tabiques fibrosos, prácticamente acelulares, o ser amplias y contener yuxtapuestos los restos de varios tractos portales, expresión de colapso lobulillar previo. Macroscópicamente, el tamaño del hígado es variable, tanto menor cuanto mayor es la fibrosis. La superficie es irregular y puede presentar grandes nódulos separados por profundas depresiones correspondientes a las cicatrices fibrosas.
- cirrosis mixta. También llamada micromacronodular, presenta aspectos intermedios entre los dos tipos anteriormente mencionados.
- cirrosis septal incompleta o multilobular. En esta forma, los septos fibrosos son prominentes y el parénquima puede conservar la distribución acinar normal, cuando los nódulos tienen gran tamaño

Las frecuencias relativas, en tantos por ciento, de los diversos tipos de cirrosis hepáticas –datos obtenidos en Estados Unidos y Europa– (Stanley L *et al*, 1990¹⁸) son:

- cirrosis relacionada con el abuso de alcohol 60 a 70%,
- cirrosis postnecrótica..... 10 a 15%,
- cirrosis biliar –primaria y secundaria–..... 10%,
- cirrosis por pigmentos –hemocromatosis–..... 5%,
- cirrosis relacionada con la enfermedad de Wilson..... rara,
- cirrosis relacionada con la deficiencia de α -1-antitripsina..... rara,
- cirrosis criptogénica..... 10 a 15%.

I.4.1. Cirrosis biliar

La cirrosis biliar es consecuencia de las alteraciones provocadas en el árbol biliar. Se acompaña de dificultad para la eliminación de bilis, destrucción del parénquima hepático y de fibrosis progresiva.

Pese a las nuevas técnicas diagnósticas, que permiten evitar que la cirrosis biliar se constituya, puede ser inevitable en numerosos procesos nosológicos. Se pueden citar algunos como el colangiocarcinoma, que afecta a un segmento pequeño del colédoco, y que, por lo general, provoca una insuficiencia hepática derivada de una cirrosis biliar secundaria; lo mismo ocurre en un 10% a un 15% de los pacientes que han sufrido una estenosis biliar, secundaria a un traumatismo (o ligadura) del colédoco durante una intervención quirúrgica; otro ejemplo podría ser la pericolangitis, que es un proceso

inflamatorio crónico inespecífico, que compromete de forma difusa a los conductos biliares intrahepáticos de mediano y gran calibre, lo que desencadena el proceso patológico en cuestión (Farreras *et al*, 1996¹²).

Desde el punto de vista fisiopatológico se puede distinguir dos tipos: la cirrosis biliar primaria y la cirrosis biliar secundaria (apartados I.4.1.1 y I.4.1.2 respectivamente).

I.4.1.1. Cirrosis biliar primaria

No se conoce exactamente la causa de la cirrosis biliar primaria. Se sugiere que pudiera intervenir una respuesta inmunitaria alterada. (Farreras *et al*¹²)

I.4.1.2. Cirrosis biliar secundaria

Aparece como consecuencia de una obstrucción prolongada, parcial o total, del conducto biliar común (colédoco) o de sus ramas principales. Su manifestación está condicionada por cualquier proceso (atresia de las vías biliares, litiasis coledocal, estenosis benignas o malignas de la vía biliar principal, tumores, colangitis esclerosante, etcétera) que ocasione un bloqueo del flujo biliar durante un tiempo prolongado que, en general, se estima como mínimo de 3 meses (Ginés P *et al*, 1987⁶).

En las primeras semanas tras la obstrucción de los conductos biliares grandes se observa colestasis en las zonas centrolobulillares, en el interior de los hepatocitos, en las células de Kupffer y en los canaliculos biliares. Se detectan, igualmente, trombos biliares intracanaliculares.

La presencia de bilis en el citoplasma del hepatocito provoca, con el tiempo, su hipertrofia; y su disposición citoplásmica en finos cordones. A este tipo de lesión se le denomina degeneración plumosa. A veces, esta estructura degenerativa se ve rodeada de células normales (Scheuer PJ, 1994¹⁹).

A nivel periportal se pueden observar hepatocitos muertos que dan lugar a infartos biliares. A medida que avanza la lesión, las fibras de reticulina se sustituyen por colágena y la bilis desaparece de las zonas infartadas.

Frecuentemente, pasadas las primeras semanas y a consecuencia de las alteraciones celulares mencionadas, secundarias a la obstrucción de conductos biliares grandes, aparece cierto grado de infiltrado inflamatorio, que se restringe a las áreas colestásicas. Al principio se producen cambios inflamatorios agudos –con ensanchamiento y edematización de los espacios porta–, e infiltrado inflamatorio mixto –que incluye gran cantidad de neutrófilos– cercano a los conductos biliares (Scheuer PJ, 1994¹⁹).

Otra alteración importante es la proliferación de conductos biliares pequeños bien formados, o conductillos, en los márgenes de los espacios porta. Estos conductos proliferados pueden presentar su luz total o parcialmente obstruida; a veces están dilatados o llenos de bilis.

La proliferación de conductos biliares da lugar a la formación de espacios característicos en el tejido conjuntivo portal.

La bilis puede atravesar la pared de los conductos dando lugar a un acúmulo, o lago biliar, inicialmente extracelular.

Si la obstrucción biliar persiste más tiempo, se incrementa la formación de tejido fibroso nuevo en los espacios porta. Éstos, con el tiempo, pueden llegar a unirse, sin afectar a los hepatocitos, o, en algún caso, solo de forma leve. Tampoco se producen alteraciones importantes en las relaciones entre las venas centrales y los espacios porta.

Alrededor de los conductos interlobulillares y septales se produce una fibrosis concéntrica. Los conductos interlobulillares originales pueden, a la larga, obliterarse mientras proliferan conductos nuevos.

Generalmente, en la obstrucción biliar de grandes conductos, el infiltrado inflamatorio que rodea a los conductos y conductillos biliares, presenta neutrófilos. En consecuencia, se puede decir que existe una colangitis aguda.

La verdadera cirrosis, con nódulos hiperplásicos –de regeneración–, se presenta más tarde. Los nódulos están formados por lobulillos únicos o múltiples, separados por bandas anchas y sinuosas de tejido conectivo, constituidas por fibras paralelas (Scheuer PJ, 1994¹⁹).

Para que se produzca cirrosis en el hombre es preciso que la obstrucción biliar se prolongue de 3 a 12 meses (Farreras *et al*, 1996¹²).

Las pruebas de laboratorio detectan, casi siempre, elevaciones de la fosfatasa alcalina sérica e hiperbilirrubinemia directa. Se produce un ligero aumento de las aminotransferasas. Cuando la enfermedad se complica con colangitis, las elevaciones de las aminotransferasas y la leucocitosis son mas marcadas. Al igual que ocurre en la cirrosis biliar primaria, también se incrementan las concentraciones de lípidos séricos y aparecen los datos de laboratorio propios de la esteatorrea (Farreras *et al*, 1996¹²).

I.5. Modelos experimentales de cirrosis

A partir del primer tercio de este siglo (Cameron GR *et al*, 1936²⁰), se aborda el estudio de la cirrosis hepática experimental, mediante el desarrollo de modelos experimentales animales.

Los criterios para determinar la validez de dichos modelos son muy variados y dependen, en gran manera, del agente etiológico utilizado para el desarrollo de la enfermedad.

En general, para que un modelo experimental sea considerado como bueno, es necesario que cumpla una serie de requisitos, entre los que cabe destacar:

- la capacidad para reproducir los aspectos morfológicos correspondientes a la enfermedad humana,
- el provocar cambios patológicos discretos y graduales,
- la alta reproducibilidad y baja mortalidad.

Estos modelos experimentales, que provocan fibrosis inicialmente y que evolucionan a cirrosis con posterioridad, se han elaborado empleando hepatotoxinas; alterando el estado nutricional de los animales; interfiriendo sobre su respuesta inmune; usando mutantes genéticos; y por obstrucción del árbol biliar. No obstante, existen modelos experimentales que no se pueden encasillar en un solo apartado de esta clasificación. Un ejemplo sería, el empleo del alcohol etílico como hepatotóxico, ya que este producto altera, tanto el estado nutricional del individuo, como su capacidad de respuesta inmunológica.

Atendiendo a los agentes patogénicos mencionados, se puede realizar la siguiente clasificación:

I.5.1. Empleo de hepatotoxinas

Han sido muchas las herramientas químicas utilizadas para promover el cuadro de cirrosis hepática con fines experimentales. Se puede reseñar como las más importantes el tetracloruro de carbono, los hepatocarcinógenos y el alcohol etílico.

I.5.1.1. El tetracloruro de carbono

Los primeros estudios fueron realizados por Cameron GR *et al*, en 1936²⁰.

Mediante el uso de este producto como inductor de cirrosis hepática, se han realizado múltiples estudios, entre los que cabe destacar los encaminados a demostrar la eficacia de diferentes agentes antifibrogénicos (Nakamura N *et al*, 1975²¹; Igarashi S *et*

al, 1986²²; Rojkind M *et al*, 1979²³), alteraciones de la hemodinámica esplénica (López-Novoa JM *et al*, 1982²⁴), etcétera.

Las vías de administración de esta hepatotoxina han sido diversas, desde la inyección subcutánea (Cameron GR *et al*, 1936²⁰; Rubin *et al*, 1963²⁵), y la inhalación en cámara cerrada (López-Novoa JM *et al*, 1982²⁴), hasta la vía oral introduciendo una sonda endogástrica (Recknagel RO *et al*, 1966²⁶; Proctor E *et al*, 1982²⁷).

La exposición reiterada al tetracloruro de carbono, produce, según los anteriores autores, un cuadro cirrótico en las ratas, entre las 12 y 15 semanas, realizándose una evolución patológica semejante a la que presenta la cirrosis alcohólica humana.

Es de destacar la alta mortalidad de este modelo, sobre todo en dosis repetidas por vía oral. Es igualmente destacable la reversibilidad de la fibrosis –no de la cirrosis– si se produce la suspensión del tratamiento.

1.5.1.2. Hepatocarcinógenos

Los hepatocarcinógenos más utilizados, como inductores de cirrosis, han sido, la tioacetamida (TAA) y la dimetilnitrosamina (DMNA). Estas sustancias, suministradas en dosis bajas, provocan tumores hepáticos, mientras que a dosis elevadas provocan necrosis y, consecuentemente, fibrosis.

El empleo de DMNA, bien sea por administración oral o intraperitoneal, ocasiona la aparición de fibrosis a partir de las 4 semanas de tratamiento, en tanto que la cirrosis no aparece hasta las 13 semanas de tratamiento (Madden JW *et al*, 1970²⁸).

La TAA, suministrada en el agua de bebida, provoca cirrosis micronodular después de 3 meses de tratamiento (Zimmerman T *et al*, 1987²⁹). Durante los 2 primeros meses, los cambios histológicos son mínimos.

1.5.1.3. Alcohol etílico

El consumo excesivo de alcohol constituye el mayor factor etiológico en la fibrosis y en la cirrosis humana. Los modelos que utilizan este hepatotóxico presentan dos importantes problemas:

- la aversión natural que los animales tienen a la ingesta de alcohol,
- la incapacidad de controlar simultáneamente el estado nutricional y la intoxicación etílica.

En 1963, Lieber CS *et al*³⁰, emplearon al etanol como parte de la dieta de las ratas, suministrándolo, en su totalidad, en forma líquida. Con ello consiguieron una imagen histológica de hígado graso, pero no de fibrosis ni de necrosis, ya que los animales consumían una dieta escasa, por su rechazo a la ingestión de alcohol. Por otro lado, las ratas son unos animales con una capacidad metabólica para este tóxico muy elevada, lo que hace que los niveles sanguíneos sean muy bajos. Más tarde, y debido a los motivos anteriores, se utilizaron monos (mandriles), en los que se sustituía el 50% de las calorías de su dieta en forma de etanol. Mediante el uso de estos animales, sí se consiguió reproducir las alteraciones morfológicas hepáticas, así como la cronología de su aparición. Pero este proceso cirrótico solo se producía en una tercera parte de los animales tratados y después de 1 a 3 años de tratamiento, con el elevado coste económico que ello supone.

Tsukamoto H *et al*, en 1984³¹, basaron sus investigaciones en la hipótesis de trabajo de que es necesario un gran aporte de alcohol y elevados niveles sanguíneos, para provocar el daño hepático esperado.

Dada la fobia que las ratas poseen por naturaleza hacia el consumo de alcohol, se les implantó un catéter intragástrico permanentemente. El aporte etílico supuso el 47% del total de calorías de la dieta, lo que permitió mantener altos niveles sanguíneos

(Tsukamoto H *et al*, 1985³²). Utilizando este sistema, se provocaron fibrosis a partir de los 3 meses de tratamiento, pero sin que se llegara a establecer el proceso patológico cirrótico.

1.5.2. Alteración del estado nutricional

Otra forma de atentar contra la estructura hepática originando verdaderos cuadros de cirrosis consiste en provocar un determinado desequilibrio alimenticio, mediante la disminución de ciertas sustancias en la dieta o bien exagerando el suministro de otras.

1.5.2.1. Dieta baja en proteínas y colina y rica en grasas

En las ratas, las dietas bajas en proteínas y en colina, y con un alto nivel de grasas, provocan una cirrosis (Blumberg H *et al*, 1941³³) que aparece entre las 12 y 24 semanas de la dieta. El patrón morfológico que se produce es muy semejante al que aparece en la cirrosis alcohólica humana. Las desventajas principales de este modelo se resumen en: distinta respuesta a la dieta, según el animal utilizado; duración prolongada del experimento y dificultad para estudiar su evolución patológica (Rubin E *et al*, 1967³⁴).

1.5.2.2. Dieta con etionina

El suministro de etionina, en ratas jóvenes, añadido a una dieta hipoprotéica, y con bajo aporte de metionina, da lugar a una fibrosis hepática difusa, pero no a necrosis. Este modelo simula las lesiones que, en el ámbito histológico, se producen en etapas tempranas durante el abuso del alcohol (Rubin *et al*, 1967³⁴). No es buen inductor de la cirrosis experimental, debido a su alta mortalidad y al hecho contradictorio que supone la formación de septos fibrosos sin aparición de un cuadro cirrótico.

1.5.3. Interferencia sobre la respuesta inmunológica

Determinadas acciones sobre el sistema inmunitario pueden provocar fibrosis y otras alteraciones de la estructura hepática, pero no los típicos cambios histológicos que definen a la cirrosis hepática.

1.5.3.1. Suero heterólogo

En 1965³⁵ y 1966³⁶, Paronetto F *et al*, demostraron cómo determinados componentes inmunológicos estaban relacionados con la fibrogenesis hepática. Entre las sustancias antigénicas más utilizadas se podría destacar el suero de cerdo y de caballo, la seroalbúmina de huevo y de cerdo, la γ -globulina humana y la globulina sérica porcina.

A las 5 semanas de tratamiento, usualmente por inyección intraperitoneal, se producía fibrosis hepática, pero no cirrosis.

1.5.3.2. Productos procedentes de la pared celular bacteriana

Al igual que en el anterior modelo, ciertas sustancias procedentes de la pared celular bacteriana producen, mediante una alteración de la respuesta inmunológica, una fibrosis hepática. Este es el caso de la inyección intraperitoneal en rata, de fragmentos de un polisacárido (péptidoglicano) procedente de la pared celular de un estreptococo (Wahl SM *et al*, 1986³⁷).

1.5.3.3. Endotoxina

La utilización de endotoxinas fue sugerida al observar que determinados agentes antimicrobianos hacían de protectores hepáticos frente a la cirrosis provocada por CCl₄ (Leach BE *et al*, 1941³⁸; Ledue EH *et al*, 1973³⁹). Sin embargo, el uso de endotoxinas solo conducía a fibrosis y no a cirrosis. Además, en el ámbito histológico, se producían alteraciones inespecíficas de la estructura hepática, como acumulación lipídica entre hepatocitos, ensanchamiento del espacio de Disse, dilatación de los conductos biliares,

activación de las células de Von Kupffer, etcétera.

1.5.4. Inducción genética

Existe una raza de ratón mutante –ratón rinoceronte– poseedor de un gen recesivo autosómico, que desarrolla fibrosis hepática espontánea. Esta cualidad se ha utilizado en los estudios relacionados con el conocimiento de los mecanismos inmunológicos de la fibrosis hepática (Fujimoto M *et al*, 1985⁴⁰). En homocigotos para este gen, de más de 6 meses de edad, aparece, de forma espontánea, un grado moderado de fibrosis periportal.

Este modelo se podrá utilizar en el futuro para estudiar los mecanismos genéticos de la fibrogénesis.

1.5.5. Obstrucción del árbol biliar

Los primeros estudios sobre cirrosis biliar secundaria experimental los llevó a cabo Benjamín Brodie, en 1823⁴¹, utilizando gatos. Posteriormente se han realizado experiencias empleando otras especies animales como ratas, conejos, perros y monos.

Los resultados obtenidos han sido muy variados, al compararlos dentro de una misma especie, o en relación con otras. En ciertos casos, se produce recanalización de la obstrucción biliar, lo que provoca la reversibilidad de determinados cambios histológicos (Trams EG *et al*, 1957⁴²). En otras ocasiones, como se verá más adelante, y debido a determinadas condiciones fisiológicas, la recanalización se produce por generación de colaterales que restablecen el flujo biliar. Es importante destacar los trabajos sobre este particular realizados por Brodie B, en 1823⁴¹; Legg JW, en 1873⁴³; Charcot LM *et al*, en 1876⁴⁴, y Foà P *et al*, en 1877⁴⁵.

Varios autores han proseguido el estudio de este modelo experimental de cirrosis biliar, siendo dignos de subrayar los trabajos de Cameron GR y Oakley CL, en 1932⁴⁶, seguidos, bastantes años después, en 1958, por los realizados por Cameron y Hassan SM⁴⁷.

En relación con el tiempo de obstrucción del conducto colédoco, necesario para que se produzca cirrosis hepática, existen discrepancias. Autores como Cameron GR *et al*. (1958⁴⁷), dicen conseguirlo entre 3 y 5 semanas; otros como Mc Donald RA *et al*. (1961⁴⁸), Carter M (1966⁴⁹), Moritz M *et al*. (1972⁵⁰), Johnstone JMS *et al*. (1976⁵¹) y Franco D *et al*. (1979⁵²) aumentan el intervalo postligadura entre 2 y 6 semanas. Más tarde, en 1984, Kountouras J *et al*⁵³, publicaron que los primeros cuadros cirróticos –sin indicar su tanto por ciento– aparecían a partir de 15 días después de la ligadura, y en un 66% de los casos iniciales a los 28 días.

Hoy día, existe unanimidad respecto a que el modelo quirúrgico causa la hepatopatía cirrótica en menor tiempo que los otros modelos; pero no hay acuerdo sobre el momento preciso en que se produce.

No hay conformidad respecto a las alteraciones morfológicas que cronológicamente se producen hasta llegar al estado cirrótico; ni sobre la evolución en el tiempo de esta hepatopatía una vez instaurada; ni tampoco sobre las afectaciones que se ocasionan sobre otros órganos distintos del hígado.

Convendría aunar criterios sobre la curva de supervivencia en el uso de este modelo, junto con los correspondientes exámenes morfológicos y fisiológicos.

Respecto al restablecimiento del flujo biliar tras la ligadura del colédoco, existen discrepancias y distintos enfoques que, como réplica, han ocasionado las siguientes hipótesis:

- tras la dilatación del colédoco proximal, como consecuencia de su ligadura, se

produciría un prolapso de las paredes del saco sobre la ligadura –que “abrazaría” esta zona– ; posteriormente su adherencia; y, finalmente, la necrosis de las paredes unidas, restableciéndose entonces el flujo biliar (Kraus GE *et al*, 1959⁵⁴).

- la recanalización del colédoco sería causada por el crecimiento de nuevos canales procedentes del epitelio biliar preexistente, partiendo del colédoco distal hacia el proximal (Wright JE *et al*, en 1962⁵⁵ y 1964⁵⁶).

En la presente década este modelo experimental está siendo ampliamente utilizado para el estudio de distintos hepatoprotectores y de diversos inhibidores de la peroxidación lipídica secundaria a la propia enfermedad o por la acción de fármacos hepatotóxicos (Muriel P *et al*, 1994⁵⁷).

II. Interrogantes, hipótesis y objetivos de investigación

metabólicas e iónicas–; y de determinados parámetros hematológicos –valor hematocrito y actividad de la protrombina–,

- rechazo o aceptación de las hipótesis nulas planteadas.

Se pretende contribuir a aclarar equívocos, si los hubiere; a verificar si los resultados del presente experimento coinciden, o no, con los obtenidos por otros autores; y a llenar ciertos vacíos informativos existentes sobre este modelo experimental.

II. INTERROGANTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

II.1. Interrogantes

El planteamiento previo de la investigación provoca la aparición de ciertas interrogantes, que se formulan esquemáticamente a continuación:

- la ligadura y sección del colédoco de la rata, ¿provocaría un cuadro de cirrosis biliar secundaria?,
- transcurrido un determinado periodo de tiempo, ¿morirían todos los animales aquejados de esta enfermedad?,
- caso de sobrevivir algún animal, ¿cómo se habría restablecido el flujo biliar?,
- ¿se producirían daños a distancia sobre otros órganos como consecuencia de la colestasis quirúrgica?,
- ¿cuál sería el comportamiento de las constantes fisiológicas fundamentales?,
- ¿sería un buen modelo experimental de cirrosis biliar secundaria?

II.2. Hipótesis

En un intento de responder a las anteriores cuestiones se plantean las siguientes hipótesis.

II.2.1. Hipótesis conceptual

La colestasis crónica provoca un síndrome de cirrosis biliar secundaria.

II.2.2. Hipótesis estadísticas

• Hipótesis nulas:

- la colestasis crónica en la rata no origina su muerte,
- la doble ligadura y sección del colédoco de la rata no provoca una cirrosis biliar secundaria,
- la doble ligadura y sección del colédoco de la rata no altera las arquitecturas hepática, renal, esplénica ni pulmonar,
- la doble ligadura y sección del colédoco de la rata no afecta ni al hematocrito ni a la actividad de protrombina; tampoco a las constantes séricas enzimáticas –creatin fosfoquinasa, gamma glutamil transpeptidasa, aspártico transaminasa, alanin transaminasa, láctico deshidrogenasa y fosfatasa alcalina–; a los sustratos metabólicos –albúmina, proteínas totales, bilirrubinas total y directa, creatinina, urea, glucosa, colesterol, triglicéridos y ácido úrico–; constantes iónicas –calcio, hierro, sodio y potasio–; ni a las fracciones electroforéticas – α_1 -globulinas, α_2 -globulinas, β -globulinas y γ -globulinas–.

• Hipótesis alternativas: rechazo de la hipótesis nulas.

II.3. Objetivos

Sobre la base del desarrollo de un modelo experimental de cirrosis biliar, mediante la doble ligadura y sección del colédoco de la rata, en el presente trabajo se proponen como objetivos fundamentales los siguientes:

- estudio de la supervivencia de este modelo experimental, profundizando sobre el hecho de la posible repermeabilización del colédoco,
- examen de las alteraciones histológicas –hepáticas, esplénicas, renales y pulmonares–; de las principales constantes bioquímicas séricas –enzimáticas,

III. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Como en el apartado anterior se señalaba, el presente trabajo pretende confirmar una hipótesis determinada y evidenciar relaciones "causales" entre variables independientes y variables dependientes. Para conseguirlo se han utilizado dos tipos de diseño de investigación:

- investigación experimental basada en una estrategia prospectiva longitudinal. Se relaciona la aparición de la respuesta (muerte) en un grupo sometido a colestasis crónica, con el momento en que se produce durante la fase de seguimiento de 5 meses (152 días). Este es el estudio de supervivencia.
- investigación experimental basada en el estudio clínico, mediante una estrategia prospectiva transversal. Este es el estudio efectuado sobre una serie de evolución patológica. Se puede deducir que la doble ligadura y la sección del colédoco son la causa de las diferencias observadas en relación con los grupos de control preestablecidos, y en los aspectos descritos en los objetivos de este trabajo.

Para abordar los significados estudios, se ha precisado el material y el método que, a continuación, y en apartados separados, se detalla.

III.1. MATERIAL

Seguidamente se detallan los componentes empleados, imprescindibles para la consecución de los objetivos planteados.

III.1.1. Instalaciones

El trabajo se ha realizado íntegramente en el Servicio de medicina y cirugía experimental del Hospital Militar Central "Gómez Ulla".

De este prestigioso Centro, se ha recibido, igualmente; el inestimable apoyo del Servicio de anatomía patológica, para el estudio histológico de las piezas anatómicas; y el del Laboratorio central de análisis clínicos, para la realización de las correspondientes determinaciones séricas y hematológicas.

III.1.2. Animales

Se ha utilizado un total de 220 ratas.

III.1.2.1. Características

Machos, de raza wistar, con pesos comprendidos entre 250 g y 300 g, correspondientes a una edad entre 8 y 10 semanas.

III.1.2.2. Estabulación

Se colocaron en jaulas de macrolón de 35 cm de ancho, 60 cm de largo y 20 cm de alto, a razón de 5 ratas por jaula. Como base para la recogida de heces y orina de las ratas se utilizó sepiolita, en gránulos absorbentes.

Se han cumplimentado estrictamente las normas vigentes en la Unión Europea (UE) respecto al alojamiento y a los cuidados de animales destinados a la experimentación (86/609/CEE).

III.1.2.3. Alimentación

Se suministró agua y comida *ad libitum*. Los alimentos sólidos, se proporcionaron prensados, elaborados por Piensos Moragón, ref. AC-10.

III.1.2.4. Condiciones del bioterio

Acondicionamiento según los estándares habituales para roedores: temperatura constante de 22°C a 24°C y fotoperiodo de 12 horas.

III.1.3. Material quirúrgico

La totalidad de las intervenciones quirúrgicas se realizaron en una sala de microcirugía dotada del mobiliario básico. Se utilizó el material quirúrgico siguiente: mango de bisturí nº 4 para hoja del nº 20 ref. BB520 Aesculap AG; pinza para coger tejidos 2 x 3 dientes de 18 cm de Ferris-Smith; pinza de disección de Adson de 12 cm; tijeras de Mayo de 15 cm; pinzas hemostáticas Halsted-Mosquito de 12 cm; portaagujas de Mayo-Heger de 15 cm; lámpara para campo quirúrgico Martin. Chromophare C-200.

III.1.4. Material fungible

Se incluye en este apartado vario: hojas de bisturí, jeringuillas diferentes, agujas de distintos tipos, material de sutura no reabsorbible (seda de 7-0 y 3-0) y reabsorbible (catgut 3-0), gasas, antisépticos, etcétera.

III.1.5. Instrumental para las determinaciones de laboratorio

Atendiendo al dato a determinar se detalla a continuación los instrumentos empleados para su valoración.

III.1.5.1. Determinación del valor hematocrito

Centrifuga y capilares heparinizados.

III.1.5.2. Determinaciones bioquímicas séricas

Autoanalizador de bioquímica clínica Technicon DAX 2000 junto con los correspondientes reactivos para la determinación de albúmina, proteínas totales, glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos, bilirrubina total, bilirrubina directa, aspártico transaminasa, alanin transaminasa, amilasa, gamma glutamil transpeptidasa, láctico deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, creatin fosfo kinasa, calcio, hierro, sodio y potasio.

III.1.5.3. Proteinogramas

Se empleó un aparato OLYMPUS HITE SYSTEM 600 para determinar las siguientes fracciones séricas: albúmina, α_1 y α_2 -globulina, β -globulina, y γ -globulina.

III.1.5.4. Actividad de protrombina

Se utilizó un equipo compuesto por un FP 401 Incubator y un FP 910 Coagulation Analyzer Labsystems.

III.1.6. Material para los estudios histológicos

En este apartado se relacionan los instrumentos empleados para la preparación de las piezas anatómicas:

- inductor automático de parafina Milles Scientific. Tissue-Tec Vip,
- microtomo Reichert-Jung mod.2035 Boicut. Leica Instruments GmbH,
- microscopio óptico Nikon optifot HFX-IIA,
- cámara fotográfica para las preparaciones, Nikon optifot FX 35-UA.

III.1.7. Material para la realización del estudio colangiográfico

Se empleó el siguiente utillaje:

- aparato de rayos X General Electric CGR Supra C 100,
- reveladora modelo AGFA CURIX 60,
- placas radiográficas AGFA CURIX RP2 24x30 cm,
- solución radiopaca de amidotrizoato sódico y amidotrizoato de meglumina (1:6,6) (Gastrogratin® Schering).

III.1.8. Material para el proceso informático de datos

Fundamentalmente se han empleado los siguientes elementos:

- ordenador SI 486/DX4 a 100 mHz,
- impresora Hewlett Packard Deskjet 600,
- videocámara Samsung mod. VPA20,
- los programas informáticos han sido:
 - Windows 95,
 - procesador de textos: Word v 7 para Windows 95,
 - hoja de cálculo: Excel v.7 para Windows 95,
 - procesador científico de gráficos Sigma Plot® -Scientific Graph System v.1.02,
 - generadores de gráficos y diapositivas:
 - Paint brush v.3.11,
 - Paint show pro v.shareware 2.0,
 - Power point 97,
 - paquete informático para captura y procesamiento de imágenes Medicus® v.3.0 (Imaginis S.L.),
 - programa estadístico para proceso de datos y gráficos SPSS v.6.1.3 para Windows.

III.2. MÉTODO

En este capítulo se describen los métodos empleados para conseguir los objetivos planteados en el presente trabajo.

III.2.1. Ligadura del conducto biliar común

Se describe los pasos realizados antes, durante y después de la práctica quirúrgica expuestos en diferentes apartados establecidos cronológicamente.

III.2.1.1. Preoperatorio

Antes de comenzar la intervención quirúrgica, cada animal fue identificado individualmente mediante un sistema especial de marcado. No se consideró necesario el ayuno anterior a la intervención.

III.2.1.2. Anestesia

Se usó anestesia gaseosa por inhalación, de éter etílico, en campana cerrada. Durante la intervención, la anestesia se mantuvo colocando en la zona nasal de la rata un cartucho, en cuyo interior se había situado un algodón impregnado con éter etílico. Una vez anestesiado el animal, se rasuró su zona ventral; se colocaron tiras de esparadrapo en las patas, para fijarlo con agujas sobre una bandeja de corcho. A continuación, se aplicó sobre la zona rasurada, una solución antiséptica de povidona yodada al 10%. A partir de este momento, y hasta su conclusión, la intervención quirúrgica se llevó a cabo en un ambiente estéril.

III.2.1.3. Abordaje quirúrgico, ligadura y sección del conducto biliar común

Utilizando guantes estériles se cubre al animal con un paño fenestrado estéril.

Se efectúa una incisión longitudinal de 2 cm por la línea media abdominal, justo debajo del cartilago xifoides. Se tracciona el duodeno, para localizar el conducto biliar común, practicándose una doble ligadura, a 1 cm de su desembocadura en el duodeno, con material no reabsorbible (seda 7-0) y seguida de transección. Posteriormente, se sutura la herida quirúrgica con sutura reabsorbible (catgut 3-0) para el peritoneo y la capa muscular, y no reabsorbible (seda 3-0) para la piel.

III.2.1.4. Reanimación

No fue necesario ningún cuidado especial, pues la recuperación de la anestesia fue inmediata, y no presentó problemas. Únicamente fue necesario lavar cualquier resto de sangre para evitar agresiones entre los animales de una misma jaula.

III.2.1.5. Cuidados postoperatorios

Se colocaron 5 ratas por jaula, con agua y comida *ad libitum*; vigilando el estado de la herida por si se abría, en cuyo caso se procedió a su reparación. Se retiraron los puntos de sutura superficiales a los 5 días de la intervención.

III.2.2. Preparación de las distintas series de animales

Se ha dispuesto de un total de 220 ratas, distribuidas en 4 series, de la siguiente manera:

III.2.2.1. Serie de control

Formada por las 10 ratas que se utilizaron para la toma de los datos basales hematológicos y bioquímicos, señalados en los apartados III.1.5.1. y III.1.5.2., respectivamente. Previa anestesia gaseosa con éter etílico, se sacrificó cada animal mediante exanguinación por punción intracardiaca. De esta forma, se obtuvieron 8 cm³ a 10 cm³ de sangre, que se emplearon para realizar las determinaciones señaladas en el apartado III.1.5.

El estudio histológico de referencia, se realizó en hígado, bazo, pulmones, conducto biliar común y riñones.

Para comprobar el contenido biliar del colédoco en situación basal se utilizó una aguja de 0,5 mm de diámetro y 1 cm de longitud, acoplada a una jeringa de 1 ml; se introdujo en la luz del colédoco a 1 cm de su desembocadura en el duodeno; y se extrajo toda la bilis contenida en el segmento comprendido entre la zona de punción y el hilio hepático.

III.2.2.2. Serie de operación simulada

Compuesto por 10 ratas. Se estudiaron las alteraciones producidas en las constantes sanguíneas como consecuencia de la manipulación quirúrgica de la zona sin llegar a la ligadura del colédoco. Transcurridos 7 días de la intervención quirúrgica, se procedió a su exanguinación según el método que se indica (apartado III.2.3) y se realizaron las determinaciones fisiológicas citadas en el apartado III.2.3.1.

III.2.2.3. Serie de supervivencia

Formada por 100 ratas. Los componentes de esta serie fueron sometidos a la ligadura y transección del conducto biliar común (apartado III.2.1.). La supervivencia de los animales objeto de estudio se verificó diariamente.

Transcurridos 5 meses, exactamente 152 días desde la ligadura del colédoco, se hicieron colangiografías de las ratas supervivientes para determinar el estado del colédoco. Para ello, cada rata fue anestesiada previamente con una inyección intramuscular (0.03 ml/gr de peso) de una solución de diazepam (50 mg/ml); atropina (1 mg/ml); ketamina (50 mg/ml) en proporción 5:1:2 respectivamente. Posteriormente, se practicó una laparotomía media abdominal amplia para localizar el colédoco en su parte proximal. Se extrajo del mismo 1,5 ml de su contenido para, posteriormente, inyectar igual cantidad de una solución radiopaca (Gastrografin® Schering) utilizando una jeringa de 1 ml, provista de aguja de 0,5 mm de diámetro. Se traccionó del duodeno a ambos lados de la zona prevista en la desembocadura del colédoco en su parte distal. Después de inyectado el contraste, se impresionaron placas radiográficas a 45 Kv y 6 mAs.

Terminadas las colangiografías, se sacrificó el animal por sobredosis anestésica. Se extrajo el hígado para su estudio anatomopatológico, junto con el colédoco dilatado y el segmento de duodeno donde éste afluye en condiciones normales. Se colocaron en un envase con formol al 10% procediéndose según se indica en el apartado III.2.5.

III.2.2.4. Serie de evolución patológica

Formada por 100 ratas. Se practicó la ligadura y la sección del conducto biliar común a todos los componentes de la serie.

Se sacrificaron 5 ratas semanales, durante un periodo de 6 semanas; en total 30 ratas. Para evitar el sacrificio de aquellas ratas que hubieran conseguido la reperiabilización del colédoco, se eligieron las que mostraban ictericia, como indicador de colestasis.

El sacrificio se realizó, bajo anestesia con éter etílico, por exanguinación por punción intracardiaca. La sangre así obtenida, se empleó en las determinaciones bioquímicas y hematológicas anteriormente señaladas, apartados III.1.5.1., III.1.5.2 (a excepción de la amilasa pancreática), III.1.5.3 y III.1.5.4.

Al igual que en la serie precedente, se practicó la necropsia de cada animal sacrificado o muerto de forma espontánea, procediendo a su correspondiente estudio anatomopatológico según lo que se indica en los apartados III.2.4 y III.2.5.

III.2.3. Exanguinación intracardiaca

Se utilizó una aguja de 0,8 mm de diámetro y 25 mm de longitud, acoplada a una

jeringa de 10 cm³. Anestesiado el animal con éter etílico, se coloca en posición de decúbito dorsal. Con los dedos índice y pulgar de la mano izquierda, a través de la masa intercostal, se localiza el corazón percibiendo sus contracciones. Por el lado intercostal izquierdo se introduce la aguja hasta el corazón, procediendo, con la jeringa acoplada, a la exanguinación total.

Con esta técnica se obtiene de 8 cm³ a 10 cm³ de sangre, que se distribuye de la siguiente manera:

- 1 cm³ en un tubo "lavado" con EDTA tripotásico como anticoagulante, destinado al estudio hematológico (apartado III.1.5.1.),
- 2 cm³ en un tubo con 0,2 cm³ de citrato sódico (1:9) como anticoagulante, para la determinación de la actividad de protrombina (apartado III.1.5.4),
- el resto, de 5 cm³ a 7 cm³, en un tubo siliconado, sin anticoagulante, pero con gel de silicona como separador mecánico. Previa retracción del coágulo e se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. En el suero obtenido se realizan las determinaciones bioquímicas precitadas (apartados III.1.5.2. y III.1.5.3.).

III.2.3.1. Determinaciones analíticas en sangre

En este apartado se indican los métodos empleados en el análisis de cada una de las constantes fisiológicas sanguíneas.

III.2.3.1.1. Determinación del valor hematocrito

Se carga con sangre un capilar heparinizado de 5 cm de longitud por 0,1 cm de diámetro, sellando posteriormente uno de sus extremos con cera. Seguidamente se procede a su centrifugación a 1000 r.p.m. durante 6 minutos. Se calcula, utilizando una escala métrica elaborada para el caso, el porcentaje correspondiente a la fracción celular.

III.2.3.1.2. Actividad de protrombina

Se ha utilizado el método de la STA Neoplastina® Plus. Boehringer Mannheim.

III.2.3.1.3. Determinaciones bioquímicas séricas

Los parámetros bioquímicos se han obtenido siguiendo los criterios y recomendaciones de la Federación Internacional de Química Analítica (IFCC).

III.2.3.1.3.1. Enzimas

Se indica, seguidamente, las enzimas estudiadas y los métodos empleados para determinarlas:

- aspártico transaminasa (AST o GOT): método de la NADH/málico deshidrogenasa (Bergmeyer HU, 1978⁵⁸),
- alanin transaminasa (ALT o GPT): método de la NADH/láctico deshidrogenasa (Bergmeyer, 1978⁵⁸),
- gamma glutamil transpeptidasa (GGT): método de la gamma-glutamyl-p-nitroanilida (Szasz G, 1976⁵⁹),
- láctico deshidrogenasa (LDH): método del piruvato/NADH (Richards AH, 1975⁶⁰),
- fosfatasa alcalina (AP): método de la p-nitrofenil fosfato (Tietz NW, 1986⁶¹),
- creatin fosfo kinasa (CPK): método de la creatinina fosfato/ADP (Szasz G, 1976⁵⁹).

III.2.3.1.3.2. Sustratos metabólicos

Se indica, a continuación, los sustratos metabólicos estudiados y sus métodos de determinación:

- albúmina (ALB): método del verde de bromocresol (Doumas BT, 1971⁶²),
- proteínas totales (PROT): método de Biuret modificado (Gornall AG, 1949⁶³),
- glucosa (GLU): método de la hexoquinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. (Department of Health, 1974⁶⁴),
- urea (UREA): método de la ureasa (Talkè H, 1965⁶⁵),
- creatinina (CREA): método del ácido pícrico (Rossignol B, 1984⁶⁶),
- ácido úrico (UA): método de la uricasa/peroxidasa (Trinder P, 1969⁶⁷),
- colesterol (CHOL): método de la colesterol esterasa y colesterol oxidasa (Allain CC, 1974⁶⁸),
- triglicéridos (TRIG): método de la glicerol fosfato oxidasa (Fossati P, 1982⁶⁹),
- bilirrubinas total (Bt) y directa (Bd): método del ácido sulfanílico (Van der Berg, 1986⁷⁰).

III.2.3.1.3.3. Concentraciones iónicas

A continuación se enumeran las constantes iónicas y los métodos usados para su determinación:

- calcio (Ca): método de la o-cresolfaleína complexona (Gitelman HJ, 1967⁷¹),
- hierro (Fe): método de Artiss (Artiss JD, 1983⁷²),
- sodio (Na) y potasio (K): método del electrodo selectivo (Eisenman G, 1967⁷³).

III.2.3.1.4. Proteinograma

Se ha empleado el método electroforético.

III.2.4. Necropsias

Se practicó la necropsia de las ratas sacrificadas semanalmente, de las muertas de forma espontánea y de las supervivientes.

Por laparotomía media abdominal se accede a la cavidad peritoneal.

Se extrajeron, para examen macroscópico (apartado III.2.6.1) y microscópico (apartado III.2.6.2), hígado, bazo, riñones y pulmones –en la serie de evolución patológica–; e hígado, colédoco y duodeno –en ratas supervivientes de la serie de supervivencia–.

III.2.5. Estudio anatomopatológico

Comprende este apartado los métodos empleados en los estudios anatomopatológicos macroscópicos y microscópicos de las piezas anatómicas reseñadas en el anterior.

III.2.5.1. Macroscópico

Se consideró el aspecto macroscópico de las piezas anatómicas, obtenidas en la necropsia.

III.2.5.2. Microscópico

Las piezas remitidas para su estudio fueron fijadas en aldehído fórmico al 10%, talladas, incluidas en parafina, y cortadas según la técnica habitual, a 3 micras de grosor.

Una vez fijadas las secciones histológicas en portaobjetos, se emplearon distintas técnicas de tinción:

- hematoxilina-eosina,
- Wilder (tinción con sales de plata para fibras de reticulina),

- tricrómico de Masson.

Se practicaron microfotografías de los cortes histológicos más interesantes.

III.2.6. Método estadístico

El presente trabajo experimental, como se describe en el apartado III, corresponde a un estudio de supervivencia –serie de supervivencia–, cuyos datos se recogen en el momento en que aparecen –estrategia longitudinal–; y un ensayo clínico –series de evolución patológica, control y operación simulada–, donde los resultados se obtienen en momentos temporales predeterminados –estrategia transversal–.

El proceso estadístico difiere según procedan los datos de uno u otro tipo de estudio. Estos extremos se detallan en los siguientes apartados.

III.2.6.1. Estudio de supervivencia

III.2.6.1.1. Variables

- Independiente: tiempo de colestasis –medido en días completos–.
- Dependiente: proporción acumulada de supervivencia –en tantos por uno–.

III.2.6.1.2. Tabulación de resultados: matriz de datos

Los resultados se presentan en tres columnas:

- en la primera se indica el nº de cada caso,
- en la segunda se registra el tiempo de participación de cada sujeto (t obsv.), es decir, el tiempo transcurrido desde la entrada del sujeto en el experimento hasta la última observación realizada en el mismo, siendo el periodo máximo de observación de 5 meses (152 días),
- en la tercera se muestra el estado del sujeto al final de la participación (ult obsv.): 1 = vive y 0 = muerto o perdido.

Si el tiempo de participación va seguido de un signo + significa que: o se trata de un caso perdido, o corresponde a un tiempo incompleto, es decir, que ha sobrevivido a los 152 días de observación.

III.2.6.1.3. Índices descriptivos para valoración de variables

Para valorar la supervivencia –proporción acumulada de supervivencia– se utiliza un índice descriptivo basado en ordenaciones y no en momentos dado la fuerte asimetría que presenta esta distribución. La tendencia central se expresa mediante la mediana y como medida de dispersión la distancia intercuartil (IQR) descrita por los cuartiles 1º y 3º.

III.2.6.1.4. Representación gráfica

Los índices descriptivos basados en ordenaciones se representan mediante diagramas de caja ("box plots") para poner de manifiesto la posible asimetría de los datos. En estos gráficos se indican, si procede, con ° y * los valores exteriores y alejados, respectivamente.

El estudio de supervivencia merece un tratamiento especial. Su representación gráfica se genera, como en el apartado siguiente se verá, mediante el proceso de los datos obtenidos por el denominado método actuarial o de tablas de vida.

La representación gráfica, así obtenida, se corresponde con un diagrama de líneas escalonadas, en cuyo eje de abscisas se sitúa la variable independiente tiempo; y en el de ordenadas la variable dependiente proporción acumulada de supervivencia.

III.2.6.1.5. Técnica estadística para comparación de variables

Se ha utilizado un estudio específico denominado método actuarial o de tablas de vida, desarrollado principalmente con las aportaciones de Berkson *et al*, en 1950⁷⁴ y Cutler *et al*, en 1958⁷⁵.

III.2.6.2. Ensayo clínico –estudio de evolución patológica–

III.2.6.2.1. Variables

- Independiente. El tiempo de colestasis –medido en días completos–.
- Dependientes. Atendiendo a su naturaleza se clasifican en:
 - categorías: presencia o ausencia de una determinada característica histológica, así como la cantidad de individuos de cada categoría a estudio,
 - cuantitativas: datos métricos con magnitudes continuas.

III.2.6.2.2. Índices descriptivos para valoración de variables

Para medir la distribución de los datos se han utilizado los siguientes índices estadísticos:

- índices descriptivos basados en momentos para variables cuantitativas:
 - como medida de tendencia central se utilizó la media aritmética,
 - como medida de dispersión se utilizó la desviación estándar.

Los resultados fueron expresados como media aritmética (desviación estándar).

- medidas de frecuencias de un suceso para variables cualitativas:
 - razones: para presentar los resultados categóricos obtenidos durante el estudio experimental, se utilizaron las razones expresadas como proporciones.

III.2.6.2.3. Representación gráfica

La representación gráfica de elección fue el diagrama de cajas –“box plots”–.

III.2.6.2.5. Técnicas estadísticas para comparación de variables

Según las recomendaciones realizadas por Fisher RA, en 1925⁷⁶, que siguen siendo válidas por consenso de las propias publicaciones científicas actuales, se establece como mínimo intervalo de confianza (IC) el 95%, despreciando el 2,5% de cada una de las dos colas (5% total) de las distribuciones muestrales. Esto implica un grado de significación estadística de $p < 0,05$.

Para la comparación entre las variables independiente –tiempo– y dependientes, atendiendo a la naturaleza de las últimas, se dispuso el siguiente procedimiento:

- Variables cuantitativas.
 1. Exploración de datos y detección de anomalías. Condiciones previas:
 - bondad de ajuste a una distribución normal, mediante el cumplimiento del test de normalidad de Shapiro Wilks,
 - verificación de igualdad de variancias entre los resultados de cada categoría, a través del test de Levene.
 2. Pruebas de independencia.
 - Comparación de 2 medias:
 - t de Student Fischer, cuando ambas muestras no contradicen el supuesto de normalidad,
 - U de Mann Whitney, cuando alguna muestra vulnera el supuesto de normalidad.

➤ Comparación entre una variable dependiente con otra independiente con varias categorías:

- análisis de la variancia (ANOVA); cálculo de la intensidad de la relación dependiente utilizando el coeficiente η^2 , cuando no se vulnera, en los datos obtenidos, el supuesto de normalidad y el de homogeneidad de las variancias; y contrastes múltiples a posteriori mediante el procedimiento de Bonferroni,
- Test de Kruskal Wallis, cuando se vulnera, en cualquier categoría, el supuesto de normalidad o el de homogeneidad de las variancias y contrastes múltiples a posteriori mediante el procedimiento de Bonferroni.

- Variables categóricas.

El método empleado para estas variables fue la comparación simple de razones expresadas como proporciones.

Nota: por motivos estadísticos se emplea el término “comparación de grupos” cuando el enfrentamiento estadístico se realiza entre una serie completa –serie control o serie de operación simulada– con un grupo perteneciente a la serie de evolución patológica.

III.2.7. Cronograma

Este procedimiento consta de las siguientes etapas ordenadas en orden cronológico:

Primero. establecimiento de las constantes fisiológicas empleando la serie de control,

Segundo. observación de las alteraciones que, a los 7 días, provoca la laparotomía sobre las constantes fisiológicas basales. Para ello se realiza el estudio de estos datos sobre la serie de operación simulada. Así se pueden descartar las alteraciones detectadas durante esta primera semana postquirúrgica, consecuentes a la laparotomía,

Tercero. estudio de la supervivencia como consecuencia de la doble ligadura y sección del colédoco. Se establece, en general, la mortalidad provocada por el modelo experimental.

Cuarto. análisis de las alteraciones fisiológicas e histomorfológicas que tienen lugar en intervalos semanales, y durante las 6 semanas de observación del experimento. Se realiza en la serie de evolución patológica.

IV. EXPOSICION DE RESULTADOS

IV.1. Serie de control

Como se describe en el apartado III.2.2.1, esta serie suministra la información de la situación basal hematológica y bioquímica, señalada en los apartados III.1.5.1. y III.1.5.2., respectivamente.

IV.1.1. Constantes sanguíneas

Se establecieron los valores correspondientes a las constantes sanguíneas de referencia. Para ello se dividieron en dos grupos, atendiendo a la muestra a analizar:

- constantes bioquímicas: determinadas sobre el suero sanguíneo,
- constantes hematológicas: establecidas sobre sangre entera.

IV.1.1.1. Constantes bioquímicas séricas

Según la naturaleza de los datos a determinar se dividieron en tres grupos: enzimas, sustratos metabólicos o iones.

IV.1.1.1.1. Constantes enzimáticas

Se determinó la concentración basal de las constantes enzimáticas según métodos descritos en el apartado III.2.3.1.3.1.

Los resultados finales se expresan como media aritmética (desviación estándar), \bar{x} (DE).

Se detallan los intervalos de confianza (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ (95% de confianza).

Las actividades enzimáticas vienen expresadas en unidades internacionales por litro (U/l).

	<i>CPK</i>	<i>GGT</i>	<i>AST</i>	<i>ALT</i>	<i>LDH</i>	<i>AP</i>
\bar{x} (DE)	184(33)	3(1)	97(9)	57(7)	212(67)	258(49)
95% IC	159-209	2,3-3,5	89,9-104	52-63	161-263	220-295

Tabla 1. Constantes enzimáticas en situación basal (U/l).

IV.1.1.1.2. Sustratos metabólicos

Se cuantificaron, en situación basal, las constantes metabólicas según métodos citados en el apartado III.2.3.1.3.2.

Los resultados finales se expresan como media aritmética (desviación estándar), \bar{x} (DE).

Se detallan los intervalos de confianza (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ (95% de confianza).

Se debe señalar el caso de la bilirrubina directa (DBIL) que no se detecta dado que la sensibilidad del método empleado no permite medir concentraciones de este metabolito menores de 0,1mg/dl. Una vez establecida la colestasis –como se verá más adelante, en los resultados procedentes de la serie de evolución patológica–, y al ser la concentración de DBIL > 0,1mg/dl, el método permite la cuantificación.

	ALB (g/dl)	PROT (g/dl)	TBIL (mg/dl)	DBIL (mg/dl)	CREA (mg/dl)
\bar{x} (DE)	3,3(0,1)	6,3(0,3)	0,1(0,0)	0,0(0,0)	0,5(0,05)
95% IC	3,2- 3,4	6,1- 6,5	-	-	0,4- 0,5

	UREA (mg/dl)	GLU (mg/dl)	CHOL (mg/dl)	TRIG (mg/dl)	UA (mg/dl)
\bar{x} (DE)	47(4,2)	170(8)	83(13)	129(8)	0,8(0,3)
95% IC	44- 50	164- 176	73,7- 93	122,6- 135	0,58- 1,1

Tabla 2. *Sustratos metabólicos en situación basal***IV.1.1.1.3. Constantes iónicas**

Se determinó, en situación basal, la cuantía de las constantes iónicas según métodos señalados en el apartado III.2.3.1.3.3.

Los resultados finales se expresan como media aritmética (desviación estándar), \bar{x} (DE).

Se detallan los intervalos de confianza (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ (95% de confianza).

	Ca^{++} (mg/dl)	Fe^{n+} (ng/dl)	Na^+ (mEq/l)	K^+ (mEq/l)
\bar{x} (DE)	10(0,3)	145(19)	140(2)	4(0,2)
95% IC	9,9- 10,4	131-159	138- 141	3,8- 4,1

Tabla 3. *Constantes iónicas en situación basal.***IV.1.1.1.4. Proteinograma**

Se determinó, según el método indicado en el apartado III.2.3.1.4., las fracciones proteicas séricas en situación basal.

Los resultados finales se expresan como media aritmética (desviación estándar), \bar{x} (DE).

Se detallan los intervalos de confianza (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ (95% de confianza).

Los resultados del proteinograma se expresan en tantos por ciento (%).

	Albumina	Globulinas			
		α_1	α_2	β	γ
\bar{x} (DE)	52(2,3)	7,4(0,9)	6,8(0,6)	21,7(2,3)	11,6(1,8)
95% IC	50,9- 54,2	6,7- 8	6,4- 7,2	20,1- 23,3	10,3- 12,9

Tabla 4. *Proteinograma en situación basal.***IV.1.1.2. Constantes hematológicas**

Se fijaron los valores normales, en situación basal, de la actividad de protrombina y del valor hematocrito.

IV.1.1.2.1. Actividad de protrombina

Se estableció la actividad de la protrombina (PTROMB) en situación basal

según método descrito en el apartado III.2.3.4.

Los resultados vienen expresados como media aritmética (desviación estándar), \bar{x} (DE).

Se detallan los intervalos de confianza (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ (95% de confianza).

La actividad de la protrombina se expresa en tantos por ciento (%).

	<i>Protrombina</i>
\bar{x} (DE)	96(5)
95% IC	91,4- 99,6

Tabla 5. Actividad de protrombina en situación basal (%).

IV.1.1.2.2. Valor hematocrito

La determinación del índice hematocrito en situación basal, según método descrito en el apartado III.2.3.1.1, dió como resultado el siguiente, expresado como media aritmética (desviación estándar), \bar{x} (DE).

Se detallan los intervalos de confianza (IC), con un error $\alpha \leq 0,05$ (95% de confianza).

El valor hematocrito se expresa en tantos por ciento (%).

	<i>VALOR HEMATOCRITO</i>
\bar{x} (DE)	41(2)
95% IC	39,5- 42

Tabla 6. Valor hematocrito en situación basal (%).

IV. 1.2. Contenido biliar en el conducto colédoco

El resultado obtenido en el grupo de control, siguiendo el método descrito en el apartado correspondiente (apartado III.2.2.1), fue en todos los casos 0.1 ml, es decir, una media de 0,1 con una desviación estándar de 0,0.

IV.2. Serie de operación simulada

En este apartado, los datos corresponden a los valores de las constantes sanguíneas a los 7 días de la operación simulada.

Posteriormente se comparan los resultados de esta serie con los de la de control; y los de la serie de operación simulada y la de evolución patológica, a los 7 días de la intervención quirúrgica.

Para ello, si se cumple el supuesto de normalidad –test de Shapiro-Wilks– se aplica el test t de Student Fischer de comparación de dos medias. En caso contrario, se recurre al test no paramétrico U de Mann Whitney. Con ello se pretende poner de manifiesto la existencia, o ausencia, de diferencias estadísticamente significativas.

Se verificó igualmente la homogeneidad de las variancias –test de Levene–. En caso de desigualdad, se efectuó la corrección correspondiente en el cálculo de la t de Student Fischer.

IV.2.1. Determinaciones analíticas en sangre

IV.2.1.1. Valor hematocrito

La medida de tendencia central se expresa por la media aritmética (\bar{x}); la medida de la dispersión por la desviación estándar (DE).

El valor hematocrito se expone en tantos por ciento (%).

	<i>VALOR HEMATOCRITO</i>
\bar{x} (DE)	42.89(2.64)

Tabla 7. Valor hematocrito

- **Comparación de medias** a los 7 días de la intervención quirúrgica:
 - entre las series de control ($\bar{x}=40,7$; DE=1,6) y de operación simulada ($\bar{x}=42,9$; DE=2,6),
Test t de Student Fischer: $t=2,23$; $p=0,039$
 - entre la serie de operación simulada ($\bar{x}=42,9$; DE=2,6) y la serie de evolución patológica ($\bar{x}=34,2$; DE=1,5).
Test t de Student Fischer: $t=6,76$; $p=0,000$

- **Inferencia estadística.**

El hematocrito de la serie de operación simulada se incrementa de forma significativa ($t=2,23$; $p=0,039$) con respecto al de la serie de control.

El hematocrito de la serie de evolución patológica aparece disminuido muy significativamente, ($t=6,76$; $p=0,000$) en relación con el de la serie de operación simulada.

IV.2.1.2. Actividad de la protrombina

La medida de tendencia central se expresa por la media aritmética (\bar{x}); la medida de la dispersión por la desviación estándar (DE).

La actividad de la protrombina se expone en tantos por ciento (%).

	<i>Protrombina</i>
\bar{x} (DE)	91,5(7,5)

Tabla 8. Actividad de la protrombina.

- Comparación de medias a los 7 días de la operación quirúrgica:
 - entre las series de control ($\bar{x}=95,5$; $DE=5,7$) y de operación simulada ($\bar{x}=91,5$; $DE(7,5)$,
Test U Mann-Whitney: $z=-1,4134$; $p=0,1575$
 - entre las series de operación simulada ($\bar{x}=91,5$; $DE=(7,5)$ y de evolución patológica ($\bar{x}=56$; $DE=4,9$),
Test t de Student Fischer: $t=9,58$; $p=0,000$.
- Inferencia estadística
No se observan diferencias significativas ($z=-1,4134$; $p=0,1575$) entre las series de control y de operación simulada.
Sin embargo, entre esta última y el grupo de casos correspondientes a 7 días de colestasis de la serie de evolución patológica, existen diferencias de gran significación estadística ($t=9,58$; $p=0,000$).

IV.2.1.3. Bioquímica sérica

IV.2.1.3.1. Actividades enzimáticas

Se ha estudiado la actividad de las siguientes enzimas: creatin fosfo kinasa (CPK); gamma glutamil transpeptidasa (GGT), alanin amino transferasa (ALT); aspartato amino transferasa (AST); láctico deshidrogenasa (LDH); fosfatasa alcalina (AP).

La medida de tendencia central se expresa por la media aritmética (\bar{x}); la medida de la dispersión por la desviación estándar (DE).

Todas las actividades enzimáticas se exponen en unidades internacionales por litro (U/l).

	CPK	GGT	AST	ALT	LDH	AP
\bar{x} (DE)	363(168)	4,8(0,8)	126(52)	43(11)	342(208)	186(34)

Tabla 9. Actividades enzimáticas.

- Comparación de medias a los 7 días de la operación quirúrgica:
 - entre las series de control y de operación simulada,
Test t de Student Fischer/U Mann Whitney

	CPK	GGT	AST	ALT	LDH	AP
t Student	3,29		1,71	-3,27	1,86	-3,68
z M-W		-3,432				
P	0,008	0,0006	0,119	0,004	0,090	0,002

- entre las series de operación simulada y de evolución patológica.
Test t de Student Fischer/U Mann Whitney

	CPK	GGT	AST	ALT	LDH	AP
t Student	-1,59		-3,60	-3,05	-0,08	-5,10
z M-W		-3,121				
P	0,186	0,0018	0,020	0,037	0,939	0,000

- Inferencia estadística.

- CPK (U/l), incremento muy significativo ($t=3,29$; $p=0,008$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=362,7$; $DE=168,3$), respecto a los valores de la serie de control ($\bar{x}=184$; $DE=34,8$).

Sin embargo, no se produce variación significativa ($t=-1,59$; $p=0,186$) entre los valores de la CPK de la serie de operación simulada ($\bar{x}=362,7$; $DE=168,3$) y los de la serie de evolución patológica ($\bar{x}=1235$; $DE=1221$).

- GGT (U/l), incremento muy significativo ($z=-3,432$; $p=0,0006$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=4,8$; $DE=0,8$) respecto a su valor en la serie de control ($\bar{x}=2,9$; $DE=0,9$).

También aumenta, significativamente ($z=-3,121$; $p=0,0018$), en la serie de evolución patológica ($\bar{x}=34$; $DE=18,3$), respecto a la de operación simulada ($\bar{x}=4,8$; $DE=0,8$).

- AST (U/l), no se produce variación significativa ($t=1,71$; $p=0,119$) entre las series de operación simulada ($\bar{x}=125,6$; $DE=51,8$) y de control ($\bar{x}=97,1$; $DE=10$).

Sin embargo, existe un incremento estadísticamente significativo ($t=-3,6$; $p=0,02$) en la serie de evolución patológica ($\bar{x}=431,8$; $DE=186,7$), respecto a la serie de operación simulada ($\bar{x}=125,6$; $DE=51,8$).

- ALT (U/l), decremento significativo ($t=-3,27$; $p=0,004$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=43,3$; $DE=11,4$) respecto a la de control ($\bar{x}=57,4$; $DE=7,4$).

Por el contrario, se produce un aumento significativo ($t=-3,05$; $p=0,037$) en la serie de evolución patológica ($\bar{x}=182$; $DE=101,4$) respecto a la serie de operación simulada ($\bar{x}=43,3$; $DE=11,4$).

- LDH (U/l), las concentraciones de este enzima en las series de control ($\bar{x}=212,4$; $DE=71,1$) y de operación simulada ($\bar{x}=341,7$; $DE=208$) no difieren significativamente ($t=1,86$; $p=0,09$).

Lo mismo sucede ($t=-0,08$; $p=0,939$) entre la última y el grupo de 1 semana de colestasis, de la serie de evolución patológica, ($\bar{x}=349,6$; $DE=113,9$).

- AP (U/l), decremento significativo ($t=-3,68$; $p=0,002$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=185,7$; $DE=33,5$) respecto al grupo de control ($\bar{x}=257,7$; $DE=52,1$).

Al comparar la concentración de esta enzima entre el grupo de operación simulada ($\bar{x}=185,7$; $DE=33,5$) y la serie de evolución patológica ($\bar{x}=300,2$; $DE=54,3$), se observa un aumento muy significativo ($t=-5,1$; $p=0,000$) de esta última.

IV.2.1.3.2. Sustratos metabólicos

Son objeto de este estudio: la albúmina (ALB); las proteínas totales (PROT); la creatinina (CREA); la urea (UREA); la glucosa (GLU); la bilirrubina total (TBIL); la

bilirrubina directa (DBIL); el colesterol (CHOL); los triglicéridos (TRIG); y el ácido úrico (UA).

La medida de tendencia central se expresa por la media aritmética (\bar{x}); la medida de la dispersión por la desviación estándar (DE).

	ALB (g/dl)	PROT (g/dl)	TBIL (mg/dl)	DBIL (mg/dl)	CREA (mg/dl)	UREA (mg/dl)	GLU (mg/dl)	CHOL (mg/dl)	TRIG (mg/dl)	UA (mg/dl)
\bar{x} (DE)	2,9(0,2)	6,5(0,6)	0,1(0,0)	0,0(0,0)	0,6(0,04)	22(2)	146(24)	58(14)	41(18)	0,0(0,0)

Tabla 10. *Sustratos metabólicos*

- Comparación de medias a los 7 días de la intervención quirúrgica:

➤ Entre las series de control y de operación simulada,

Test t de Student Fischer/U Mann Whitney.

	ALB	PROT	CREA	UREA	GLU	CHOL	TRIG	UA
T Student	-4,96	0,68		-16,60	-3,05		-14,10	
z M-W			-3,539			-2,914		-4,042
P	0,000	0,507	0,0004	0,000	0,011	0,0036	0,000	0,0001

Nota: no se incluye ni la TBIL, ni la DBIL, dado que sus respectivas desviaciones estándar (DE) son 0.

- entre las series de operación simulada y de evolución patológica.

Test t de Student Fischer/U Mann Whitney

	ALB	PROT	CREA	UREA	GLU	TBIL	DBIL	CHOL	TRIG	UA
t Student	1,86	1,64		-3,44	-0,20				-7,44	
z M-W			-0,419			-3,646	-3,646	-2,574		-3,650
P	0,085	0,125	0,6750	0,004	0,844	0,0003	0,0003	0,0100	0,000	0,0003

- Inferencia estadística

- ALB (g/dl), decremento muy significativo ($t=-4,96$; $p=0,000$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=2,9$; $DE=0,2$) respecto a la de control ($\bar{x}=3,3$; $DE=0,09$).

Sin embargo, no existen diferencias significativas ($t=1,86$; $p=0,085$) entre las series de operación simulada ($\bar{x}=2,9$; $DE=0,2$) y la de evolución patológica ($\bar{x}=2,7$; $DE=0,2$).

- PROT (g/dl), no hay variación significativa ($t=0,68$; $p=0,507$) entre las series de control ($\bar{x}=6,3$; $DE=0,3$) y de operación simulada ($\bar{x}=6,5$; $DE=0,6$).

Tampoco la hay ($t=1,64$; $p=0,125$) entre la última ($\bar{x}=6,5$; $DE=0,6$) y la serie de evolución patológica ($\bar{x}=6,0$; $DE=0,3$).

- CREA (mg/dl), aumento muy significativo ($z=-3,539$; $p=0,0004$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=0,58$; $DE=0,04$) respecto a la de control ($\bar{x}=0,47$; $DE=0,05$).

Por el contrario, las diferencias entre la serie de operación simulada ($\bar{x}=0,58$; $DE=0,04$) y la serie de evolución patológica ($\bar{x}=0,66$; $DE=0,2$) no son estadísticamente significativas ($z=-0,419$; $p=0,6750$).

- UREA (mg/dl), decremento significativo ($t=-16,6$; $p=0,000$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=22,2$; $DE=2,04$) respecto a la de control ($\bar{x}=47,1$; $DE=4,3$).

En la serie de operación simulada ($\bar{x}=22,2$; $DE=2,04$) concentraciones significativamente ($t=-3,44$; $p=0,004$) menores que las correspondientes a la serie de evolución patológica ($\bar{x}=27,6$; $DE=4,2$).

- GLU (mg/dl), valores inferiores estadísticamente significativos ($t=-3,05$; $p=0,011$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=145$; $DE=24$), respecto a los de la de control ($\bar{x}=170$; $DE=8,2$).

Sin embargo, no se producen variaciones significativas ($t=-0,2$; $p=0,844$) entre las series de operación simulada ($\bar{x}=145$; $DE=24$) y la de evolución patológica ($\bar{x}=148$; $DE=20$).

- TBIL (mg/dl), no es posible la realización del test U Mann Whitney entre las series de control ($\bar{x}=0,1$; $DE=0,0$) y de operación simulada ($\bar{x}=0,1$; $DE=0,0$) dado que las desviaciones estándar de ambos grupos son 0.

Al comparar los resultados entre las series de operación simulada ($\bar{x}=0,1$; $DE=0,0$) y de la serie de evolución patológica ($\bar{x}=6,96$; $DE=3,23$) se aprecia una diferencia estadísticamente muy significativa ($z=-3,6457$; $p=0,0003$).

- DBIL (mg/dl), igual que ocurre en la bilirrubina total, no se puede realizar el test U Mann Whitney entre las series de control ($\bar{x}=0,0$; $DE=0,0$) y de operación simulada ($\bar{x}=0,0$; $DE=0,0$) dado que ambas medias poseen desviaciones estándar igual a 0.

Sin embargo, sí existe una diferencia muy significativa ($z=-3,6457$;

$p=0,0003$) entre el valor obtenido en la serie de evolución patológica, ($\bar{x}=5,4$; $DE=2,5$) y el de la serie de operación simulada ($\bar{x}=0,0$; $DE=0,0$).

- **CHOL** (mg/dl), valores inferiores estadísticamente significativos ($z=-2,914$; $p=0,0036$) entre la serie de operación simulada ($\bar{x}=57,5$; $DE=13,8$) respecto a los valores de la serie de control ($\bar{x}=83,4$; $DE=13,6$).

En la serie de operación simulada ($\bar{x}=57,5$; $DE=13,8$) el valor es significativamente menor ($z=-2,574$; $p=0,0100$) que el correspondiente a la serie de evolución patológica ($\bar{x}=94$; $DE=23,2$).

- **TRIG** (mg/dl), los valores de la serie de operación simulada ($\bar{x}=40,9$; $DE=17,7$) son significativamente menores ($t=-14,1$; $p=0,000$) que los de la serie control ($\bar{x}=128,9$; $DE=8,8$).

Al comparar la serie de operación simulada ($\bar{x}=40,9$; $DE=17,7$) con el grupo de la 1ª semana de colestasis, de la serie de evolución patológica, ($\bar{x}=123,8$; $DE=25,3$) se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($t=-7,44$; $p=0,000$).

- **UA** (mg/dl), valores en la serie de operación simulada ($\bar{x}=0,0$; $DE=0,0$) menores ($z=-4,042$; $p=0,0001$) que los de la serie control ($\bar{x}=0,82$; $DE=0,3$).

Existe una marcada desigualdad ($z=-3,650$; $p=0,0003$) entre el grupo de 1 semana de ligadura del colédoco, de la serie de evolución patológica, ($\bar{x}=1,3$; $DE=0,4$) y la serie de operación simulada ($\bar{x}=0,0$; $DE=0,0$).

IV.2.1.3.3. Constantes iónicas

Son objetivos de estudio de este apartado: el calcio (Ca^{++}); el hierro (Fe^{n+}); el sodio (Na^+); el potasio (K^+).

La medida de tendencia central se expresa por la media aritmética (\bar{x}); la medida de la dispersión por la desviación estándar (DE).

	Ca^{++} (mg/dl)	Fe^{n+} (ng/dl)	Na^+ (mEq/l)	K^+ (mEq/l)
\bar{x} (DE)	10,6(0,4)	144(25)	148(4)	4,5(0,2)

Tabla 11. Constantes iónicas

- **Comparación de medias** a los 7 días de la operación quirúrgica:

- entre las series control y operación simulada,

Test de Student Fischer.

	Ca^{++}	Fe^{n+}	Na^+	K^+
t Student	2,91	-0,16	5,92	5,52
P	0,009	0,874	0,000	0,000

- entre las series de operación simulada y de evolución patológica.

Test t de Student Fischer

	Ca^{++}	Fe^{n+}	Na^+	K^+
t Student	0,12	6,01	2,78	
z M-W				-2,791
P	0,909	0,000	0,16	0,0053

• **Inferencia estadística**

- Ca^{++} (mg/dl), valor significativamente mayor ($t=2,91$; $p=0,009$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=10,6$; $DE=0,37$) respecto a los de la control ($\bar{x}=10,14$; $DE=0,32$).

Sin embargo, no existen diferencias significativas ($t=0,12$; $p=0,909$) entre el grupo de 1 semana de colestasis ($\bar{x}=10,6$; $DE=0,65$), de la serie de evolución patológica, y la serie de operación simulada ($\bar{x}=10,6$; $DE=0,37$).

- Fe^{n+} (ng/dl), no existen diferencias significativas ($t=-0,16$; $p=0,874$) entre las series de control ($\bar{x}=145,1$; $DE=19,9$) y de operación simulada ($\bar{x}=143,5$; $DE=24,5$).

Sin embargo, se observa una notable diferencia ($t=6,01$; $p=0,000$) entre los resultados de las series de operación simulada ($\bar{x}=143,5$; $DE=24,5$) y de evolución patológica ($\bar{x}=68,2$; $DE=18,9$).

- Na^+ (mEq/l), valores significativamente ($t=5,92$; $p=0,000$) mayores en la serie de operación simulada ($\bar{x}=148$; $DE=3,8$) respecto a la serie de control ($\bar{x}=140$; $DE=2$).

Igualmente existen diferencias significativas ($t=2,78$; $p=0,016$) entre las series de operación simulada ($\bar{x}=148$; $DE=3,8$) y la serie de evolución patológica ($\bar{x}=143$; $DE=2$).

- K^+ (mEq/l), elevado significativamente ($t=5,52$; $p=0,000$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=4,5$; $DE=0,2$) respecto a los de la serie control ($\bar{x}=4$; $DE=0,2$).

Los resultados en los individuos de la serie de operación simulada ($\bar{x}=4,5$; $DE=0,2$) y los de la serie de evolución patológica ($\bar{x}=5,2$; $DE=0,3$), presentan diferencias muy significativas ($z=-2,791$; $p=0,0053$).

IV.2.1.4. Proteinograma

Se consideran los siguientes parámetros: albúmina; α_1 -globulinas; α_2 -globulinas; β -globulinas; γ -globulinas.

La medida de tendencia central se expresa por la media aritmética (\bar{x}); la medida de la dispersión por la desviación estándar (DE).

Las fracciones electroforéticas se exponen como tantos por ciento (%).					
	Albumina		Globulinas		
		α_1	α_2	β	γ
\bar{x} (DE)	44,7(3,4)	14,2(0,9)	6,7(1,3)	18(2)	16,5(3)

Tabla 12. *Proteinograma*

- Comparación de medias a los 7 días de la operación quirúrgica:

- entre las series de control y de operación simulada,
Test t de Student Fischer.

	Albumina		Globulinas		
		α_1	α_2	β	γ
t Student	-6,11	17,57	-0,18	-4,21	4,26
P	0,000	0,000	0,861	0,001	0,000

- entre las series de operación simulada y de evolución patológica.
Test t de Student Fischer/U Mann Whitney.

	Albumina		Globulinas		
		α_1	α_2	β	γ
t Student	0,57	20,62	-6,42	-8,28	
z M-W					-2,822
P	0,581	0,000	0,000	0,000	0,0048

- Inferencia estadística

- Albumina (%), valores significativamente menores ($t=-6,11$; $p=0,000$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=44,7$; $DE=3,4$) en comparación con la serie de control ($\bar{x}=52,6$; $DE=2,3$).

Por el contrario, no existen diferencias estadísticas significativas ($t=0,57$; $p=0,581$) entre la serie de animales sometidos a la operación simulada ($\bar{x}=44,7$; $DE=3,4$) y los de la serie de evolución patológica, ($\bar{x}=43,8$; $DE=1,8$).

- α_1 -globulina (%), significativamente mayor ($t=17,57$; $p=0,000$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=14,23$; $DE=0,9$) respecto a la de control ($\bar{x}=7,4$; $DE=0,9$).

Valores significativamente mayores ($t=20,62$; $p=0,000$), en la serie de operación simulada ($\bar{x}=14,23$; $DE=0,9$) respecto a la de evolución patológica, ($\bar{x}=5,08$; $DE=0,7$).

- α_2 -globulina (%): no hay diferencia significativa ($t=-0,18$; $p=0,861$) entre la serie control ($\bar{x}=6,8$; $DE=0,6$) y de operación simulada ($\bar{x}=6,7$; $DE=1,3$).

No ocurre lo mismo al comparar la serie de operación simulada ($\bar{x}=6,7$; $DE=1,3$) con la serie de evolución patológica, ($\bar{x}=11,36$; $DE=1,4$), pues se observan diferencias significativas ($t=-6,42$; $p=0,000$).

-
- β -globulina (%): valores significativamente menores ($t=-4,21$; $p=0,001$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=17,7$; $DE=2$) en comparación con los de la control ($\bar{x}=21,7$; $DE=2,3$).

Al comparar los resultados de las series de operación simulada ($\bar{x}=17,7$; $DE=2$) y la serie de evolución patológica ($\bar{x}=28$; $DE=2,8$) se obtiene una diferencia estadísticamente muy significativa ($t=-8,28$; $p=0,000$).

- γ -globulina (%): valores significativamente mayores ($t=4,26$; $p=0,000$) en la serie de operación simulada ($\bar{x}=16,5$; $DE=3,2$) respecto a los de la control ($\bar{x}=11,6$; $DE=1,8$).

Al compararse estadísticamente los resultados de las series de operación simulada ($\bar{x}=16,5$; $DE=3,2$) y de evolución patológica ($\bar{x}=10,4$; $DE=0,6$), se observan diferencias muy significativas ($z=-2,822$; $p=0,0048$).

IV.3. Serie de supervivencia**IV.3.1. Estudio de supervivencia****IV.3.1.1. Matriz de datos**

Los resultados se recogen en tres columnas, según se definidas en el apartado III.2.6.1.2. Se emplean las siguientes abreviaturas: t. obsv para el tiempo de observación y ult. Obsv. para la situación de cada animal –muerto = 0 y vivo = 1– al final del tiempo de observación.

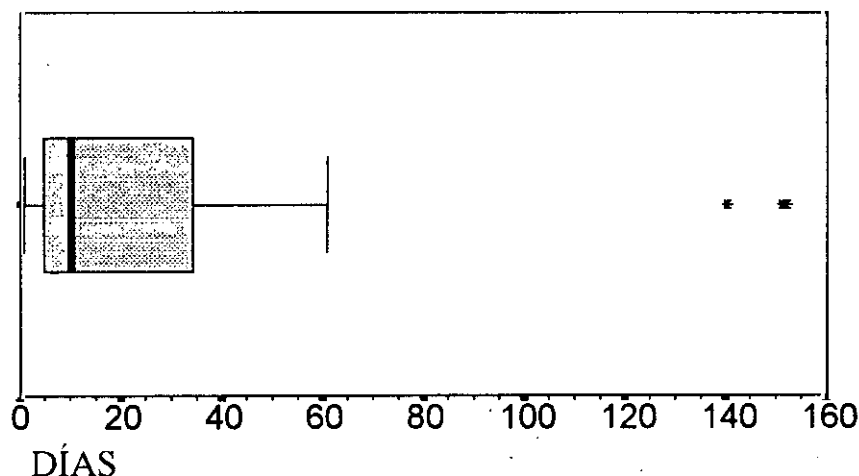
CASOS	t. obsv.	ult.obsv.	CASOS	t. obsv.	ult.obsv.	CASOS	t. obsv.	ult.obsv.
1	26	0	35	6	0	69	2	0
2	26	0	36	10	0	70	7	0
3	9	0	37	13	0	71	60	0
4	34	0	38	49	0	72	4	0
5	14	0	39	10	0	73	6	0
6	29	0	40	43	0	74	15	0
7	26	0	41	151	0	75	8	0
8	7	0	42	35	0	76	5	0
9	152+	1	43	45	0	77	5	0
10	152+	1	44	10	0	78	2	0
11	4	0	45	152+	1	79	4	0
12	7	0	46	152+	1	80	2	0
13	3	0	47	140	0	81	2	0
14	10	0	48	2	0	82	16	0
15	8	0	49	6	0	83	16	0
16	35	0	50	23	0	84	152+	1
17	45	0	51	152+	1	85	10	0
18	6	0	52	152+	1	86	3	0
19	16	0	53	22	0	87	2	0
20	40	0	54	8	0	88	6	0
21	1	0	55	152+	1	89	7	0
22	152+	1	56	2	0	90	18	0
23	6	0	57	2	0	91	3	0
24	9	0	58	3	0	92	14	0
25	10	0	59	61	0	93	6	0
26	152+	1	60	152+	1	94	4	0
27	16	0	61	152+	1	95	12	0
28	7	0	62	1+	1	96	7	0
29	6	0	63	6	0	97	51	0
30	11	0	64	1+	1	98	2	0
31	19	0	65	1+	1	99	32	0
32	6	0	66	1	0	100	3	0
33	10	0	67	5	0			
34	152+	1	68	6	0			

Tabla 13. Matriz de datos del estudio de supervivencia.

IV.3.1.1.1. Representación gráfica de la matriz de datos

La fuerte asimetría de la distribución generada por el estudio de supervivencia, impide utilizar índices descriptivos basados en momentos que indiquen la tendencia central (media aritmética, desviación estándar, variancia, etcétera.). Se utilizan, pues, índices basados en ordenaciones. Por ello se emplea la mediana, como índice de la tendencia central, y la distancia intercuartil entre cuartiles 1º y 3º (IQR), como índice de dispersión.

La mejor representación gráfica de estas circunstancias es el diagrama de caja. Tiempos de participación de la serie de supervivencia



Los índices descriptivos, anteriormente mencionados toman los siguientes valores:

- mediana = 10,5
- percentil 25 (H1) = 6,00
- percentil 75 (H3) = 35,00

Así pues, entre los 6 y 35 días postcolestasis sobrevive el 50% de los individuos (IQR de 29 días).

Las patillas situadas a ambos lados de la caja simbolizan los denominados valores adyacentes, que corresponden al mínimo y al máximo, si no hay anomalías, de la distribución. Sin embargo, en este gráfico sí aparecen valores anormalmente alejados en la cola derecha, que se definen como los situados a un valor $> H3 + 3 \times IQR = 35 + 3 \times 29 = 122$ días. Este caso es el de los sujetos n^{os} 47 y 41, que murieron a los 140 y 151 días, respectivamente.

IV.3.1.2. Tabla de vida (método actuarial)

Gracias al procesamiento de la matriz de datos por el método actuarial, generador de la denominada tabla de vida, se obtiene, principalmente, la tasa acumulada de supervivencia y la función de riesgo correspondiente, para su posterior representación gráfica.

Este tipo de tabla se presentan las siguientes columnas:

- inicio el intervalo: refleja cada uno de los días de observación,
- entradas inicio del intervalo: muestra cuantos individuos inician cada unidad de tiempo,
- tiempos incompletos: indica el número de individuos que se pierden,
- expuestos al riesgo: representa el tanto por ciento de individuos que inician cada día, corregido por el método actuarial. Es de destacar que esta

corrección se realiza modificando los cálculos en función del número de individuos perdidos en cada momento,

- muertes en el intervalo: corresponde al registro de muertes espontáneas presentadas cada día,
- proporción acumulada de supervivencia: es la de mayor relevancia estadística. En ella se recoge el tanto por uno de individuos que iniciaron la experiencia que sobreviven cada día,
- tasa de riesgo: expresa la probabilidad condicionada por unidad de tiempo que tiene un sujeto vivo de fallecer cada día, expresada en tantos por uno.

- Tabla de vida

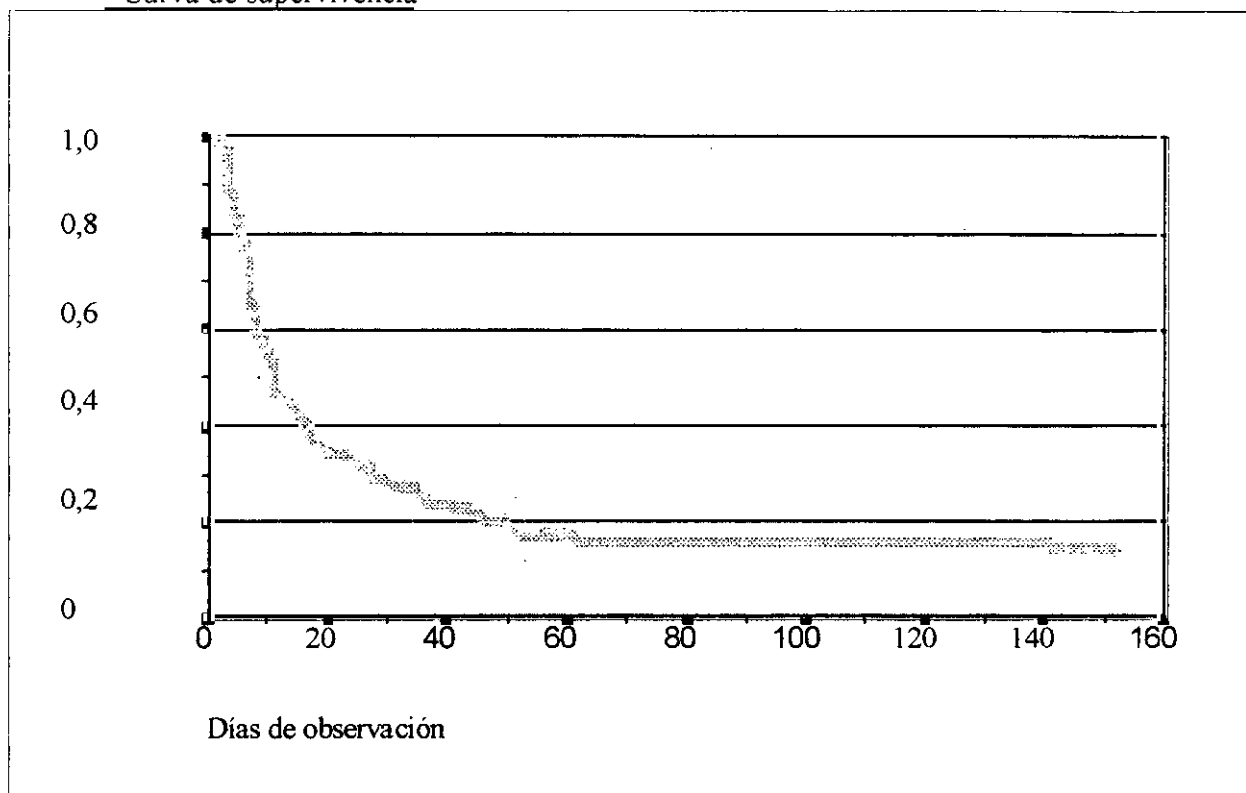
<i>Inicio del intervalo (días)</i>	<i>Entradas inicio del intervalo</i>	<i>Tiempos incompletos</i>	<i>Expuestos al riesgo</i>	<i>Muertes en el intervalo</i>	<i>Proporción acumulada de supervivencia</i>	<i>Tasa de riesgo</i>
0	100	0	100	0	1,0000	0,0000
1	100	3	98,5	2	0,9797	0,0205
2	95	0	95	9	0,8869	0,0994
3	86	0	86	5	0,8353	0,0599
4	81	0	81	4	0,7941	0,0506
5	77	0	77	3	0,7631	0,0397
6	74	0	74	11	0,6497	0,1606
7	63	0	63	6	0,5878	0,1000
8	57	0	57	3	0,5569	0,0541
9	54	0	54	2	0,5363	0,0377
10	52	0	52	7	0,4641	0,1443
11	45	0	45	1	0,4538	0,0225
12	44	0	44	1	0,4434	0,0230
13	43	0	43	1	0,4331	0,0235
14	42	0	42	2	0,4125	0,0488
15	40	0	40	1	0,4022	0,0253
16	39	0	39	4	0,3609	0,1081
17	35	0	35	0	0,3609	0,0000
18	35	0	35	1	0,3506	0,0290
19	34	0	34	1	0,3403	0,0299
20	33	0	33	0	0,3403	0,0000
21	33	0	33	0	0,3403	0,0000
22	33	0	33	1	0,3300	0,0308
23	32	0	32	1	0,3197	0,0217
24	31	0	31	0	0,3197	0,0000
25	31	0	31	0	0,3197	0,0000
26	31	0	31	3	0,2888	0,1017
27	28	0	28	0	0,2888	0,0000
28	28	0	28	0	0,2888	0,0000

<i>Inicio del intervalo (días)</i>	<i>Entradas inicio del intervalo</i>	<i>Tiempos incompletos</i>	<i>Expuestos al riesgo</i>	<i>Muertes en el intervalo</i>	<i>Proporción acumulada de supervivencia</i>	<i>Tasa de riesgo</i>
29	28	0	28	1	0,2784	0,0364
30	27	0	27	0	0,2784	0,0000
31	27	0	27	0	0,2784	0,0000
32	27	0	27	1	0,2681	0,0377
33	26	0	26	0	0,2681	0,0000
34	26	0	26	1	0,2578	0,0392
35	25	0	25	2	0,2372	0,0833
36-39	23	0	23	0	0,2372	0,0000
40	23	0	23	1	0,2269	0,0444
41	22	0	22	0	0,2269	0,0000
42	22	0	22	0	0,2269	0,0000
43	22	0	22	1	0,2166	0,0465
44	21	0	21	0	0,2166	0,0000
45	21	0	21	2	0,1959	0,1000
46-48	19	0	19	0	0,1959	0,0000
49	19	0	19	1	0,1856	0,0541
50	18	0	18	0	0,1856	0,0000
51	18	0	18	1	0,1753	0,0571
52-59	17	0	17	0	0,1753	0,0000
60	17	0	17	1	0,1650	0,0606
61	16	0	16	1	0,1547	0,0645
62-139	15	0	15	0	0,1547	0,0000
140	15	0	15	1	0,1444	0,0690
141-150	14	0	14	0	0,1444	0,0000
151	14	0	14	1	0,1341	0,0741
152+	13	13	6,5	0	0,1341	**

Tabla 14. *Tabla de vida. Factores estimativos que relacionan los individuos que entran vivos cada día y los que sobreviven.*

IV.3.1.3. Curva de supervivencia

El gráfico se genera con los datos aportados por el estudio de supervivencia, registrados en el apartado precedente. Se relaciona la proporción acumulada de supervivencia (S_t) –en tantos por uno–, en el eje de ordenadas, y el tiempo que duró la experiencia –en días–, en el eje de abscisas.

• **Curva de supervivencia**

La mediana, índice estadístico empleado para expresar la tendencia central de la distribución, a cuyo valor le corresponde por definición el 0,50 (50%) de supervivencia acumulada, coincide con los 10 días de colestasis postligadura del colédoco. Este periodo inicial es crítico. En él se produce la máxima cantidad de muertes por unidad de tiempo. Posteriormente, hasta poco más de los 60 días, esta tendencia se ralentiza aunque mantiene un claro decremento de la tasa de supervivencia. En esta segunda etapa, alcanza una proporción de supervivencia acumulada del orden de 0,15 a 0,10 (15% al 10%).

El 13% de los casos iniciales sobrevive más de 152 días a la ligadura y sección del colédoco.

IV.3.2. Estudio de las 13 ratas supervivientes

Comienza este apartado donde termina el anterior. Constituye un intento de estudiar las causas que han permitido la supervivencia de individuos sometidos a ligadura y sección del colédoco. La primera explicación posible podría estar basada en una eventual recanalización del flujo biliar hacia el colédoco. Para profundizar en los mecanismos que la posibilitan, se realizaron dos tipos de estudios, cuyos resultados se detallan en los siguientes apartados.

IV.3.2.1. Estudio colangiográfico

Las colangiografías realizadas pusieron de manifiesto que: la inyección en la zona proximal del colédoco de contraste radiopaco fluye hasta marcar radiográficamente al duodeno. De las 13 colangiografías realizadas se han obtenido los siguientes resultados:

- En 9 casos (70%) se observa la presencia de un fino conducto que une la zona proximal del colédoco al duodeno. Atendiendo al punto en el que este conducto se origina en el colédoco, se pueden hacer las siguientes observaciones:
 - en 5 casos (55%) su procedencia parece derivarse de la zona terminal del colédoco proximal (figura 1),
 - en 4 casos (45%) este conducto biliar parte de un lateral del colédoco proximal (figura 2).
- Los 4 casos restantes no aportan resultados valorables.

IV.3.2.2. Estudio morfológico del hígado y del colédoco de las ratas supervivientes

Ambas estructuras fueron sometidas a estudio macroscópico y microscópico, obteniéndose los resultados relacionados seguidamente.

IV.3.2.2.1. Observaciones macroscópicas

- Hígado: de los 13 hígados extraídos, 8 (61,5%) mantuvieron su patrón histológico normal; los 5 restantes (38,5) ofrecieron un aspecto granulado con coloración gris-verdosa.
- Colédoco: se mostró, en todos los casos, muy dilatado, sin evidenciar, macroscópicamente, su abocamiento al duodeno.

IV.3.2.2.2. Observaciones microscópicas

- Hígado:
 - 12 de los 13 órganos estudiados (92%) no mostraban alteraciones valorables (SAV), salvo una discreta proliferación ductal en los espacios porta y con mínimo infiltrado linfohistiocitario,
 - en el hilio los ductos lobulares mostraban proliferación ductal de canaliculos, como si fueran gemaciones de ellos (figura 3).
- Colédoco:
 - en todos los casos estudiados se muestra una arquitectura histológica semejante. El epitelio superficial de revestimiento de la mucosa está conservado y comprimido, pasando de una morfología cilíndrica alta a cilíndrico bajo,
 - luz dilatada,
 - fibrosis parietal discreta,
 - infiltrado inflamatorio linfohistiocitario disperso,
 - se observa, en todos los casos, una discreta proliferación ductal, sobre todo en la serosa. En 3 de los 13 casos expresados (23%), tanto el tamaño de algún ducto proliferado, como la situación de intimidad con la serosa del colédoco, hace pensar en una mayor relación estructura-función entre ambos conductos biliares con la serosa del colédoco. Cabe igualmente resaltar, que en 2 casos de los anteriormente mencionados, esta proliferación ductal es mayor en la zona del colédoco colindante con páncreas, sin observarse contenido biliar en este último.

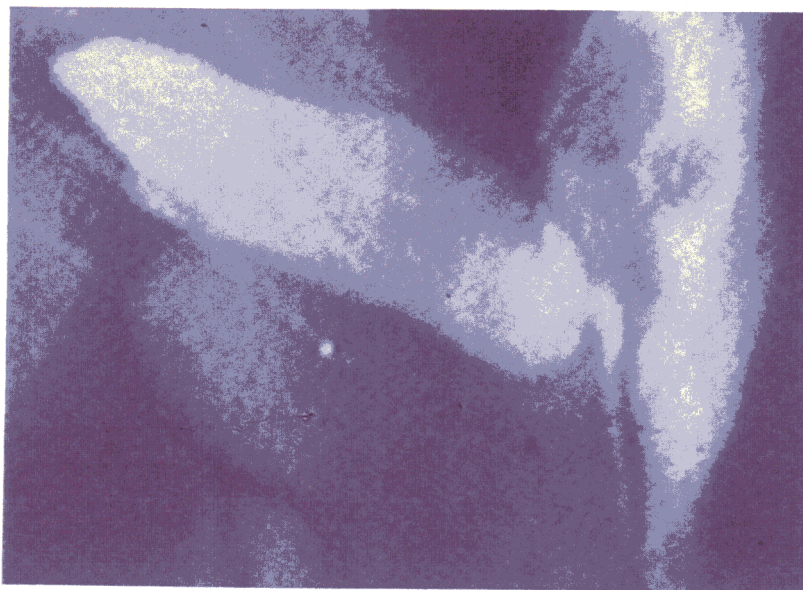


Figura 1. Colangiografía. (152 días de colestasis). Destacada dilatación del colédoco. Presencia de un conducto que drena contraste radiopaco al duodeno por un extremo.

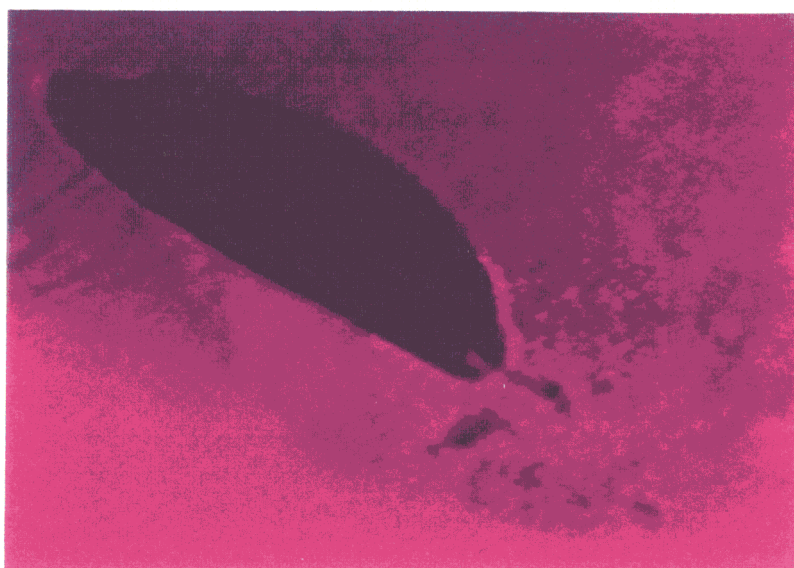


Figura 2. Colangiografía. (152 días de colestasis). Imagen colangiográfica digitalizada por sistema informático. Colédoco muy dilatado, del que parte un fino conducto que desemboca en el duodeno.

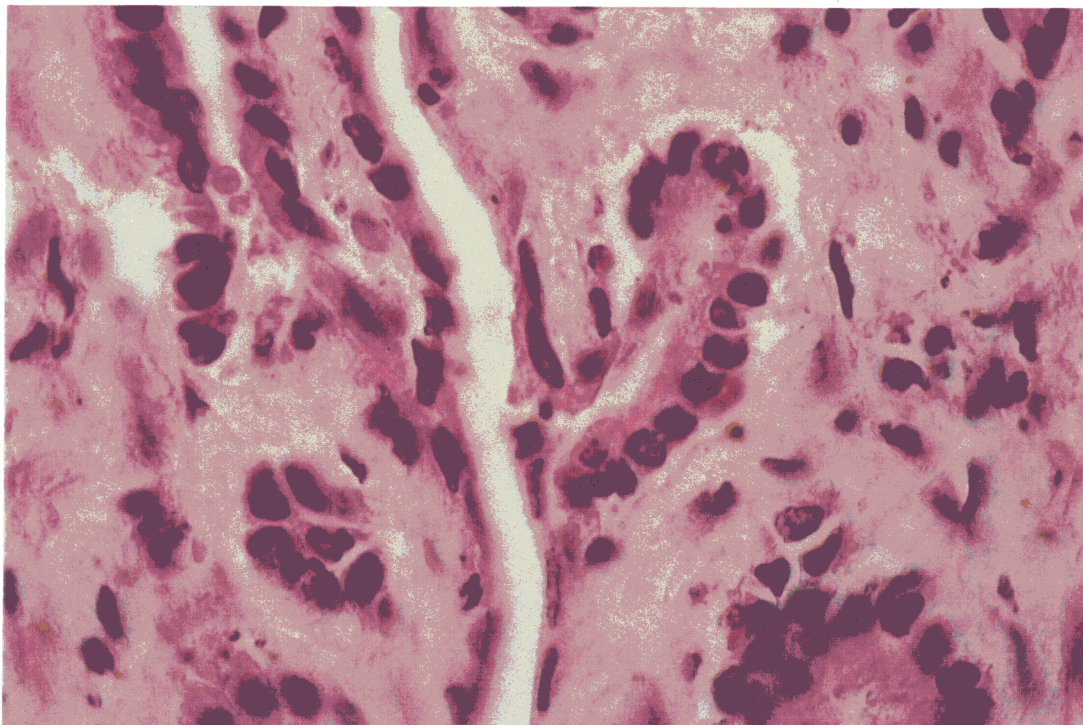


Figura 3. Microfotografía. H.E. 800x. (42 días de colestasis). Conducto biliar intrahepático del que se derivan otros ductos proliferados en forma de gemaciones.

IV.4. Serie de evolución patológica

IV.4.1. Estudio morfológico

El sacrificio programado de las ratas de esta serie permitió estudiar las alteraciones morfológicas, macroscópicas y microscópicas, de los órganos implicados en el proceso patológico, así como la cronología de su aparición. Aparte de las 5 ratas sacrificadas durante los seis periodos semanales, que duró la experiencia, se produjeron muertes espontáneas, como se recogen, a continuación, en las tablas correspondientes. Se consideró relevante el examen de los órganos procedentes de estas últimas.

IV.4.1.1. Hígado

Se examinaron un total de 100 hígados, de los que 30 pertenecían a ratas sacrificadas y el resto a las muertas espontáneamente.

IV.4.1.1.1. Observaciones macroscópicas

- **Tabla de distribución de frecuencias**

Nota: las abreviaturas cong. y nodul., utilizadas en la tabla, se corresponden, respectivamente, a congestivos y nodulares.

<i>Días</i>	<i>Ratas sacrificadas</i>	<i>Ratas muertas Espontáneamente</i>	<i>Exámen macroscópico hepático</i>
1	-	18	Congestivos
4	-	4	Congestivos
6	-	3	Congestivos
7	5	8	Congestivos
14	5	-	Congestivos
19	-	4	Congestivos
21	5	-	Nodulares
22	-	4	Nodulares
23	-	7	Nodulares
25	-	3	Nodulares
26	-	3	Nodulares
27	-	3	Nodulares
28	5	-	Nodulares
30	-	3	Nodulares
33	-	7	Nodulares
35	5	3	Nodulares
42	5	-	Nodulares
Total	30	70	47cong/53nodul.

Tabla 15. Examen macroscópico del hígado de ratas sacrificadas y de muertas de forma espontánea de la serie de evolución patológica.

La tabla muestra cómo, durante los primeros 19 días, y en todos los casos, el hígado presentaba siempre un aspecto congestivo, como de nuez moscada al corte. En los días posteriores, el aspecto hepático aparecía claramente nodular, moteado al corte.

De los 100 casos estudiados, 47 hígados eran claramente congestivos mientras que los 53 restantes eran nodulares,

IV.4.1.1.2. Observaciones microscópicas

Al estudiar microscópicamente, las alteraciones estructurales respecto a la

arquitectura hepática normal (figura 4) se estableció la siguiente:

- Tabla de distribución de frecuencias

Nota: la abreviatura Cong. vasc. utilizada en la tabla corresponde a congestión vascular

<i>Días</i>	<i>Ratas sacrificadas</i>	<i>Ratas muertas Espontáneamente</i>	<i>Exámen microscópico hepático</i>
1	-	18	Congestión vascular
4	-	4	Congestión vascular
6	-	3	Congestión vascular
7	5	8	Congestión vascular
14	5	-	Congestión vascular
19	-	4	Congestión vascular
21	5	-	Cirrosis
22	-	4	Cirrosis
23	-	7	Cirrosis
25	-	3	Cirrosis
26	-	3	Cirrosis
27	-	3	Cirrosis
28	5	-	Cirrosis
30	-	3	Cirrosis
33	-	7	Cirrosis
35	5	3	Cirrosis
42	5	-	Cirrosis
Total	30	70	47Cong. vasc./53Cirrosis

Tabla 16. Examen microscópico del hígado procedente de las ratas sacrificadas y de las muertas de forma espontánea de la serie de evolución patológica.

En los casos en que el hígado presentaba macroscópicamente un aspecto congestivo, al ser estudiados microscópicamente se correspondían con imágenes de congestión vascular (figura 5). Por otra parte, cuando el aspecto era macroscópicamente nodular, la observación microscópica manifestaba una morfología cirrótica o precirrótica. Para profundizar en el examen microscópico del hígado se consideraron los parámetros morfológicos, relacionados a continuación.

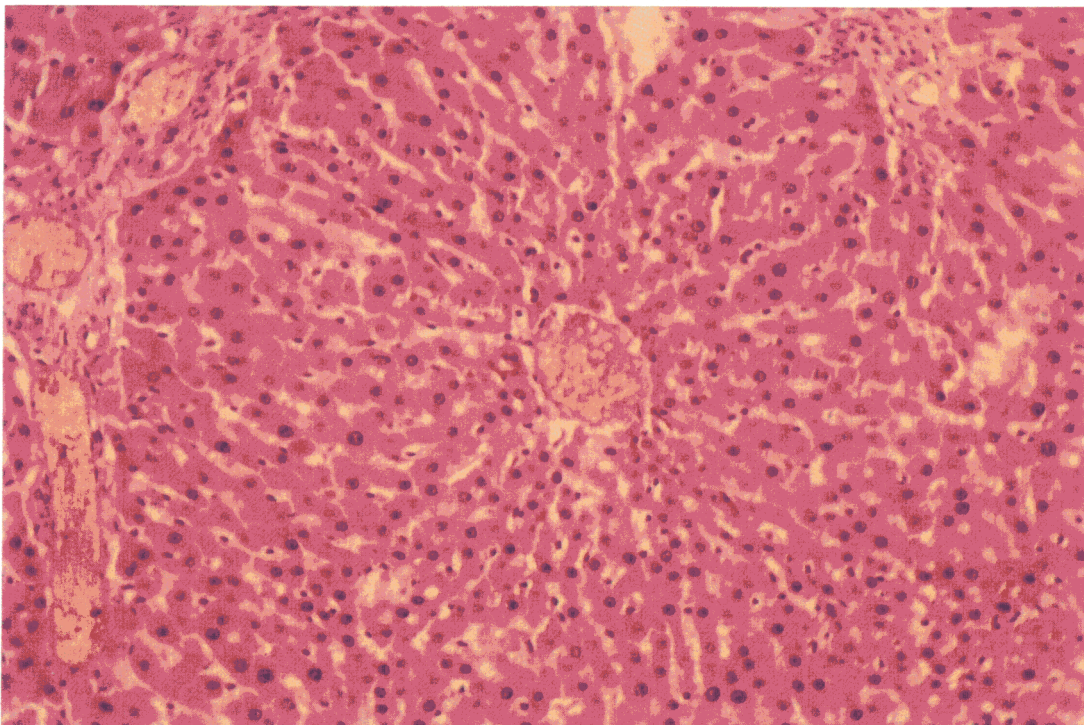


Figura 4. Microfotografía. H.E. 600x. Estructura normal de un lobulillo hepático en rata.

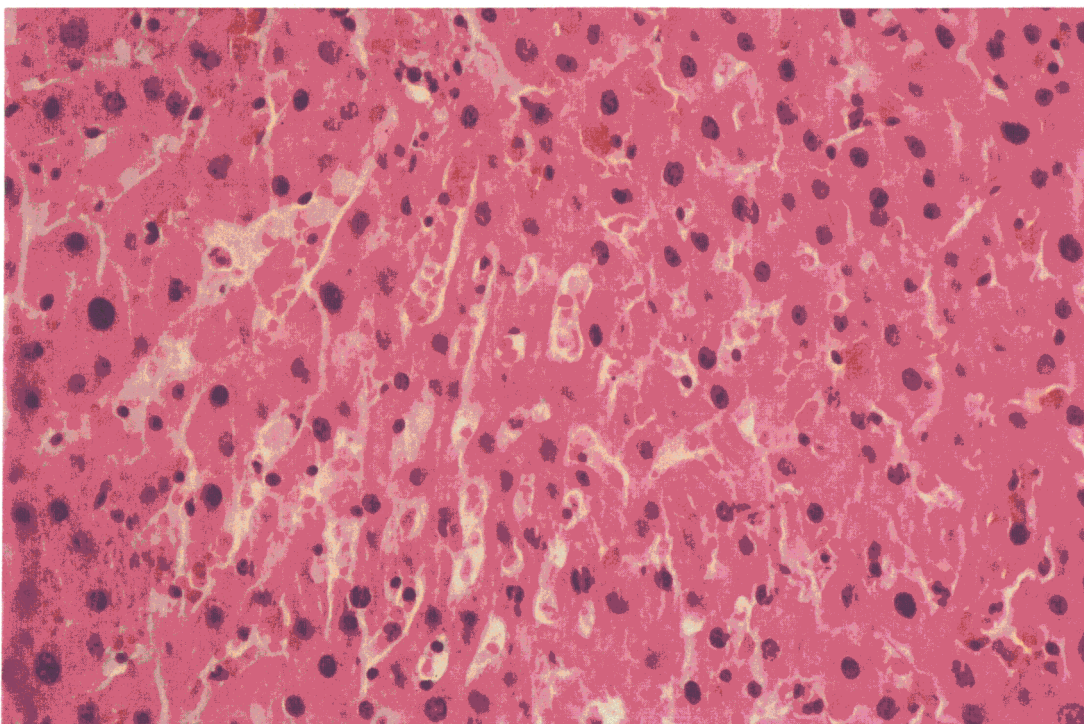


Figura 5. Microfotografía. H.E. 800x. (19 días de colestasis). Congestión de sinusoides hepáticos.

IV.4.1.1.2.1. Proliferación de ductos biliares

Los resultados que se muestran en la tabla expresan el grado de proliferación ductal, significando: (-) ausente, (+) proliferación de grado discreto, (++) proliferación moderada, y (+++) cuando es intensa.

<i>Días de colestasis</i>	<i>Proliferación de ductos biliares</i>
1	-
4	+
6	++
7	++
14	+++
19	+++
21	+++
22	+++
23	+++
25	+++
26	+++
27	+++
28	+++
30	+++
33	+++
35	+++
42	+++

Tabla 17. Proliferación de ductos biliares tras la ligadura y sección del colédoco

No hay proliferación de ductos biliares intrahepáticos a las 24 horas de la colestasis extrahepática. Sin embargo, al cuarto día se hizo patente, como se comprobó en las 4 ratas muertas de forma espontánea tras la intervención. Con posterioridad, se produce un aumento progresivo de la proliferación, alcanzando el máximo a los 14 días, y manteniéndose en esta situación hasta el final de la experiencia (figuras 6, 7 y 8).

IV.4.1.1.2.2. Fibrosis periductal e intralobulillar

Los resultados se presentan en la siguiente tabla empleando los signos siguientes: (-) fibrosis ausente, (+) fibrosis de grado discreto, (++) cuando es moderada, y (+++) cuando es intensa.

<i>Días de colestasis</i>	<i>Fibrosis periductal e intralobulillar</i>
1	-
4	-
6	+
7	+
14	++
19	++
21	+++
22	+++
23	+++
25	+++
26	+++
27	+++
28	+++
30	+++
33	+++
35	+++
42	+++

Tabla 18. Desarrollo de fibrosis periductal e intralobulillar tras la ligadura y sección del colédoco.

El incremento de fibras colágenas no es prácticamente valorable hasta la primera semana de colestasis, incrementándose progresivamente, hasta alcanzar a los 21 días su grado más alto, que se mantiene hasta al final de la experiencia (figuras 8 y 13).

En 26 de los 78 casos de fibrosis se alcanzaron fibrosis importantes, coincidiendo con mayor hepatonecrosis e infiltrado inflamatorio en los tractos intralobulillares. En estos casos se originaron nódulos de regeneración de pequeño tamaño rodeados de abundante colágena (figura 13). La fibrosis intralobulillar, sin relación directa con la proliferación ductal, se detecta a partir de los 21 días.

En los 52 casos restantes la fibrosis está directamente relacionada con la

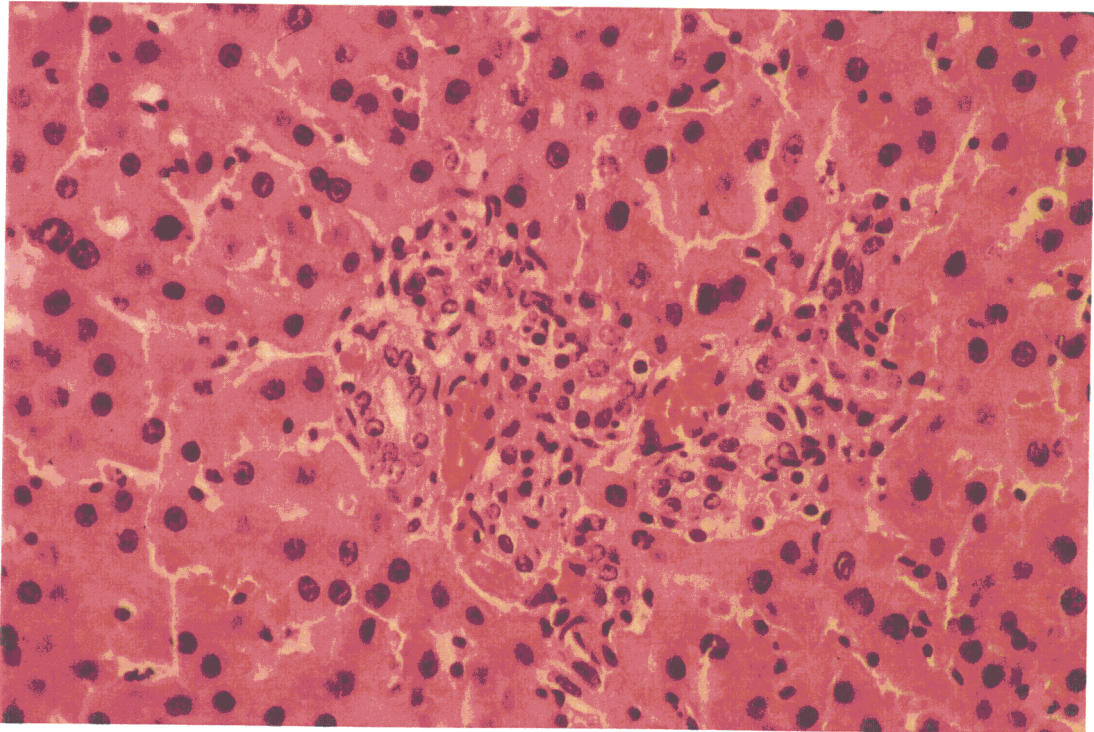


Figura 6. Microfotografía. H.E. 800x. (25 días de colestasis). Espacio porta con importante proliferación de ductos biliares. Algunos hepatocitos están “encinturados” por la proliferación ductal.

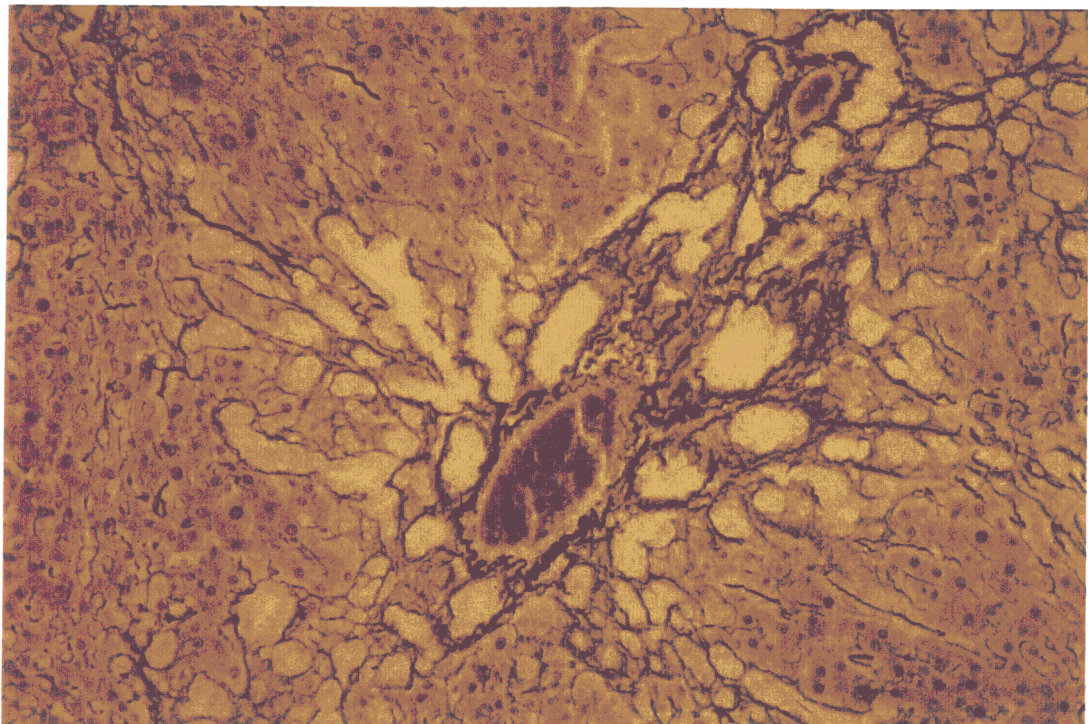


Figura 7. Microfotografía. Wilder 600x. (21 días de colestasis). Red de reticulina en un hígado, centrada en un espacio porta. Imagen reticulínica que dibuja numerosos ductos proliferados que penetran desde la periferia hacia los lobulillos hepáticos.

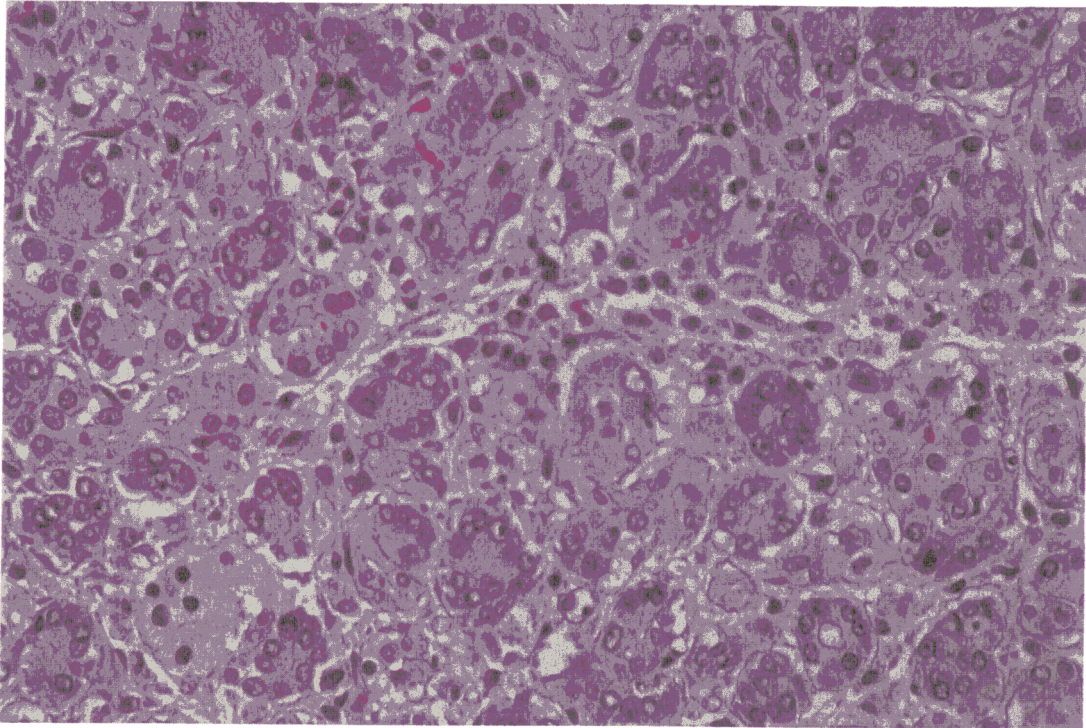


Figura 8. Microfotografía. H.E. 800x. (19 días de colestasis). Destacada proliferación de conductos biliares rodeados por fibrosis e infiltrado inflamatorio linfohistiocitario. Las luces no muestran contenido biliar y no están dilatadas.

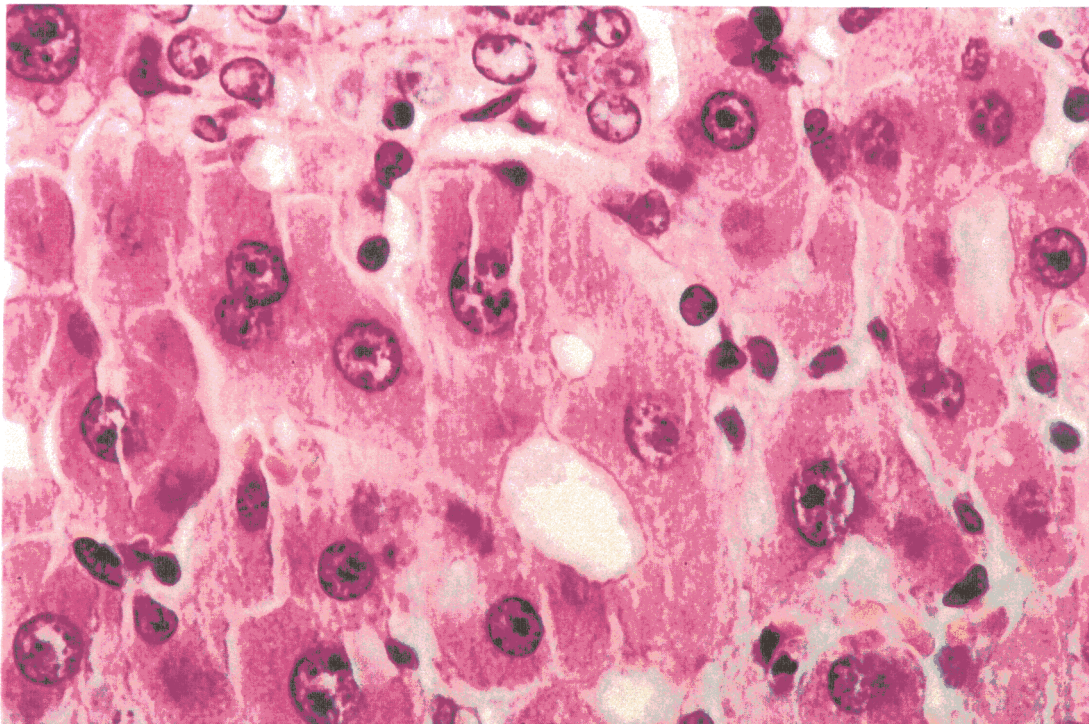


Figura 9. Microfotografía. H.E. 1000x. (30 días de colestasis). Se observan en el centro 2 canálculos biliares interhepatocitarios, sin paredes propias, muy dilatados. También se aprecia binucleación hepatocitaria.

proliferación de ductos biliares, siendo menos intensa que en los casos anteriores, y rodea directamente a los ductos proliferados –periductal–, destacando la proliferación ductal sobre la fibrosis. De estos 69 casos, en 24 la fibrosis conquista, no solo los espacios porta sino que los une, unos con otros, por invasión de los lobulillos hepáticos.

IV.4.1.1.2.3. Cirrosis

Se atendió especialmente a la definición de cirrosis que Conn HO *et al*, publicaron en 1987¹⁴. Consideran únicamente hígados cirróticos aquellos que presentan nódulos de regeneración y aumento del tejido conectivo, provocando una desorganización difusa de las estructuras lobular y vascular hepáticas. Sin embargo, no siempre este concepto de cirrosis, tan estricto, ha sido mantenido a nivel experimental y, especialmente, en los modelos de obstrucción del árbol biliar (apartado 1.5.5 y citas bibliográficas 47-53).

En este trabajo se mantiene el nombre de cirrosis con la consciencia de que, en algunos casos, convendría más el término de precirrosis o el de fibrosis. Esto es particularmente manifiesto en aquellas situaciones en las que, aun observándose una desorganización difusa de la estructura lobulillar y vascular hepática, no se muestran, con facilidad, nódulos de regeneración.

- **Tabla de distribución de frecuencias**

En la tabla que sigue se muestran los casos de cirrosis de la serie de evolución patológica y los precedentes de muerte espontánea, en función del tiempo de colestasis.

<i>Ratas sacrificadas</i>	<i>Ratas muertas espontáneamente</i>	<i>Cirrosis</i>	<i>Días de colestasis</i>
-	18	-	1
-	4	-	4
-	3	-	6
5	8	-	7
5	-	1	14
-	4	-	19
5	-	1	21
-	4	4	22
-	7	7	23
-	3	3	25
-	3	3	26
-	3	3	27
5	-	5	28
-	3	3	30
-	7	7	33
5	3	8	35
5	-	5	42
30	70	50	Totales

Tabla 19. Aparición de cirrosis hepática tras la ligadura y sección del colédoco.

En un total, de 100 ratas se obtuvieron 50 cirrosis hepáticas. Los procesos patológicos obtenidos, atendiendo a su morfología, se pueden dividir en dos grupos bien diferenciados:

- en los 24 casos restantes de cirrosis, destacó una gran proliferación de ductos y una fibrosis periductal (figuras 10, 11 y 12),

- en 26 de los hígados se encontró una imagen microscópica en la que destacaba la desaparición de cualquier rastro de venas centrolobulillares, una desestructuración hepática máxima y una gran fibrosis de colágena, independiente, en gran parte, de la proliferación ductal (figura 13).

Durante la primera semana de colestasis no se detecta ningún caso de cirrosis. El primero aparece a los 14 días, instaurándose en un 100% de los hígados a los 22 días (figuras 14 y 15).

IV.4.1.1.2.4. Infiltrado inflamatorio periductal y portal

Los resultados se presentan en la siguiente tabla empleando los signos siguientes: (+) infiltrado en grado discreto y (++) moderado.

- **Tabla de distribución de frecuencias**

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Infiltrado inflamatorio</i>
1	18	+
4	4	++
6	3	++
7	13	++
14	5	++
19	4	++
21	5	++
22	4	++
23	7	++
25	3	++
26	3	++
27	3	++
28	5	++
30	3	++
33	7	++
35	8	++
42	5	++

Tabla 20. Infiltrado inflamatorio periductal y portal tras la ligadura y sección del colédoco.

Desde el primer día de colestasis se revela infiltrado inflamatorio. Su presencia se intensifica a partir del 4º día, manteniéndose en esta tónica en el transcurso de la experiencia. En general, se comprobó que era de moderada intensidad (figuras 14 y 15). En algunos casos aislados el infiltrado fue intenso:

El infiltrado celular estaba integrado por:

- leucocitos polimorfonucleares neutrófilos: se observaron en cantidad discreta o moderada, especialmente en los primeros días de colestasis. En general se encontraban alrededor de los ductos o en tractos fibrosos. En algunos casos, poco frecuentes, su situación era intraductal, estando ligada a colangitis intensa,
- linfocitos: en moderada cantidad,
- histiocitos y
- células plasmáticas: ligadas, de modo especial, a los 26 casos de máxima necrosis hepática y formación de tractos fibrosos perinodulares de gran amplitud.

El infiltrado celular se manifestó periductalmente, y en el tejido conectivo

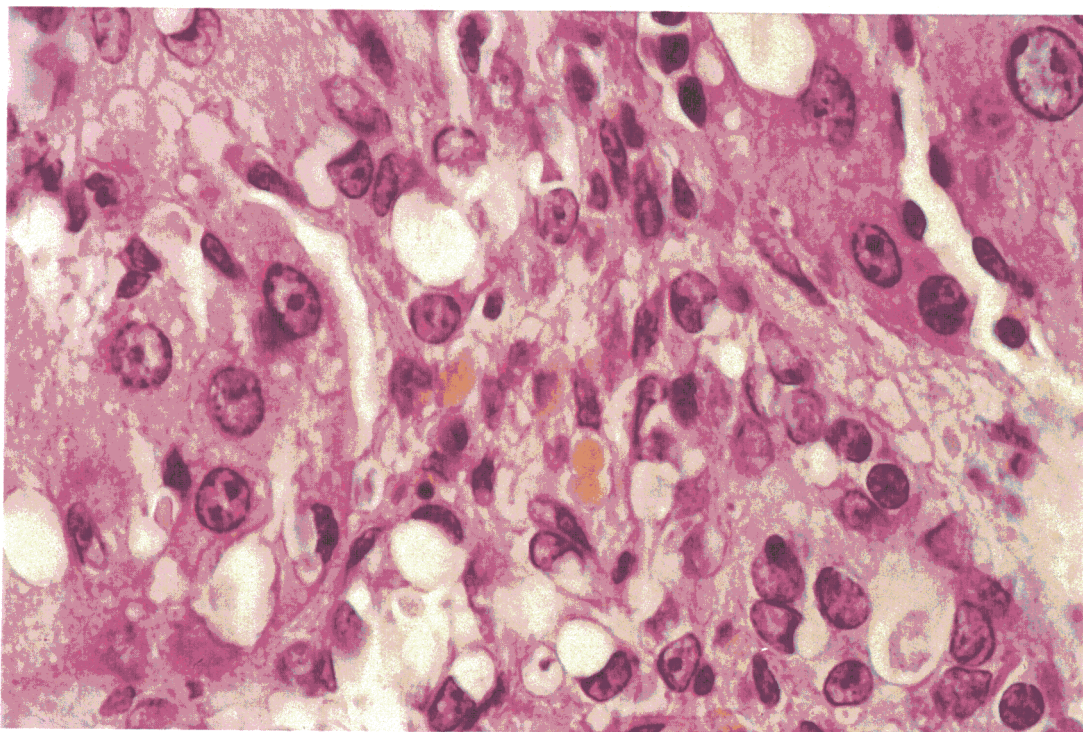


Figura 10. Microfotografía. H.E. 1000x. (30 días de colestasis). Proliferación ductal. En el centro aparecen depósitos biliares.

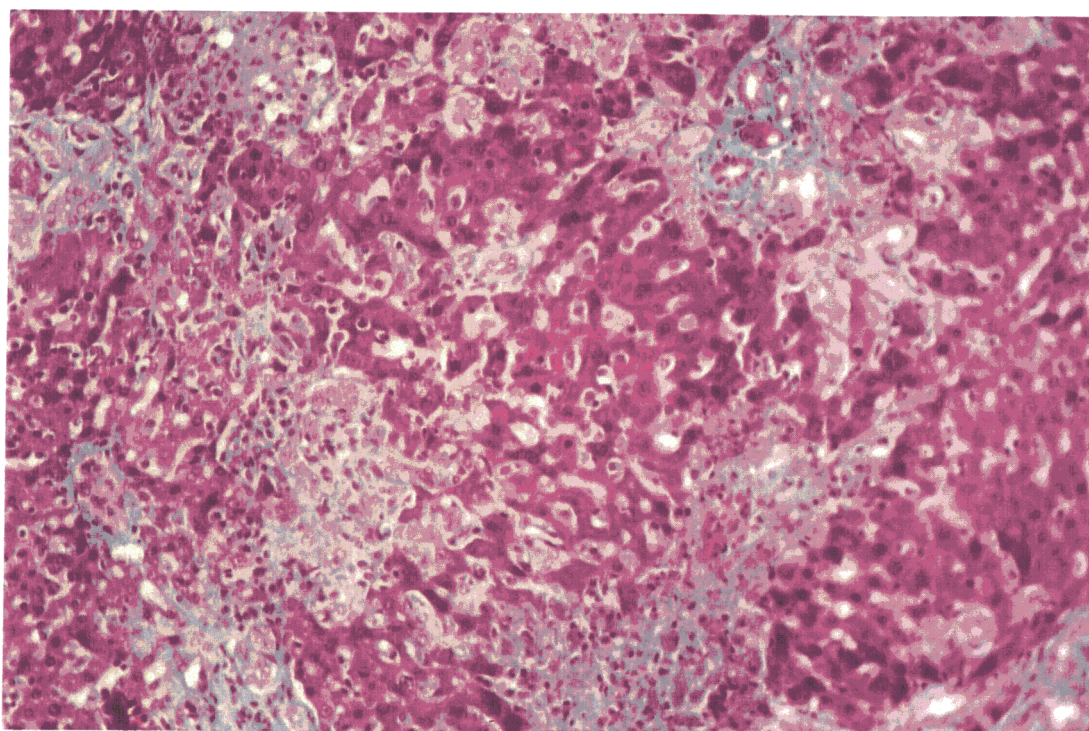


Figura 11. Microfotografía. T.Masson 600x. (26 días de colestasis). Nodulillos hepáticos —en rosa— rodeados enteramente por marcadísima proliferación ductal —en verde—.

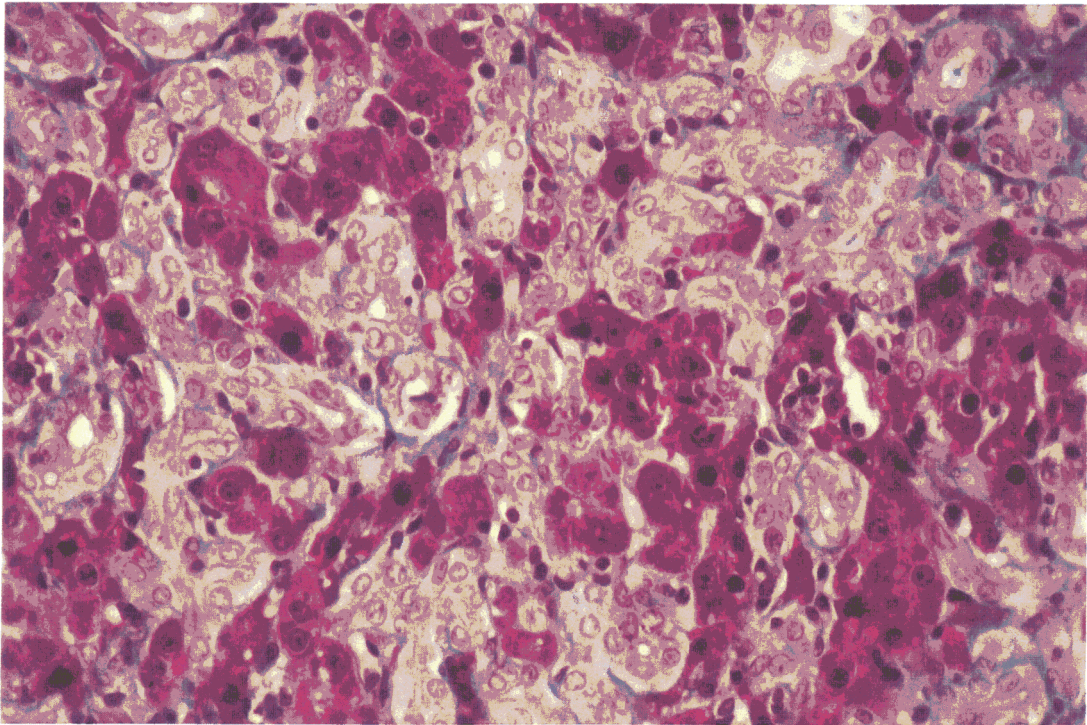


Figura 12. Microfotografía. T.Masson 800x. (22 días de colestasis). Restos de laminillas hepáticas y de nodulillos de proliferación hepatocitaria rodeados por proliferación ductal.

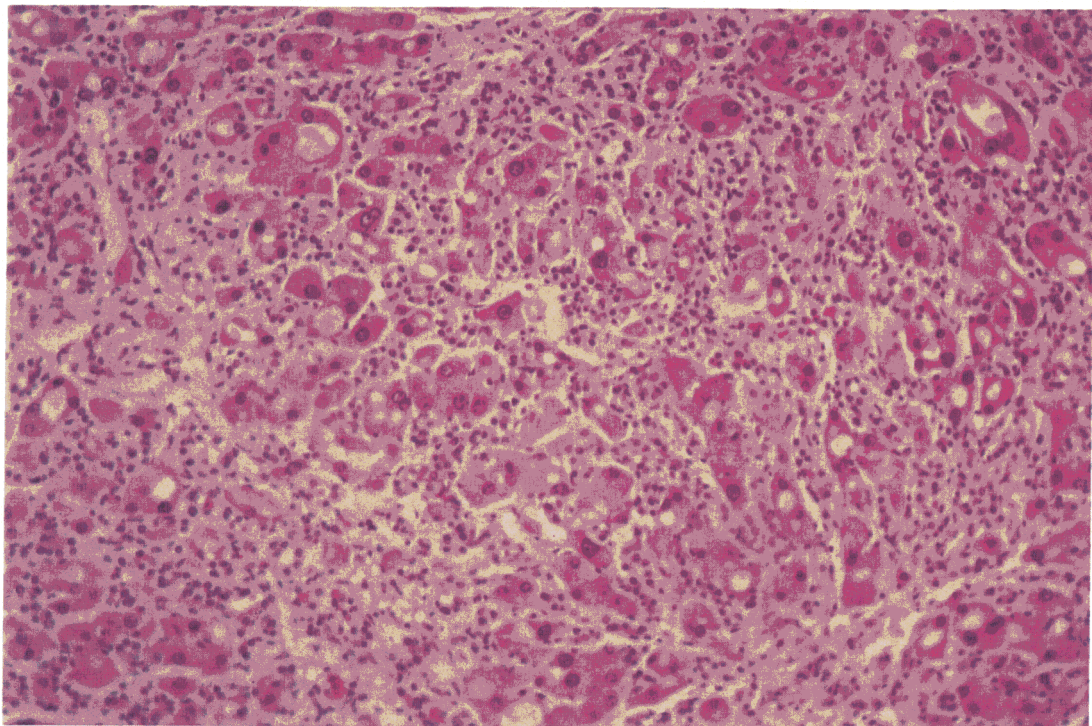


Figura 13. Microfotografía. H.E. 600x. (33 días de colestasis). Pequeños nódulos hepáticos y laminillas residuales hepatocitarias rodeados por fibrosis y por abundante infiltrado inflamatorio linfohistiocitario.

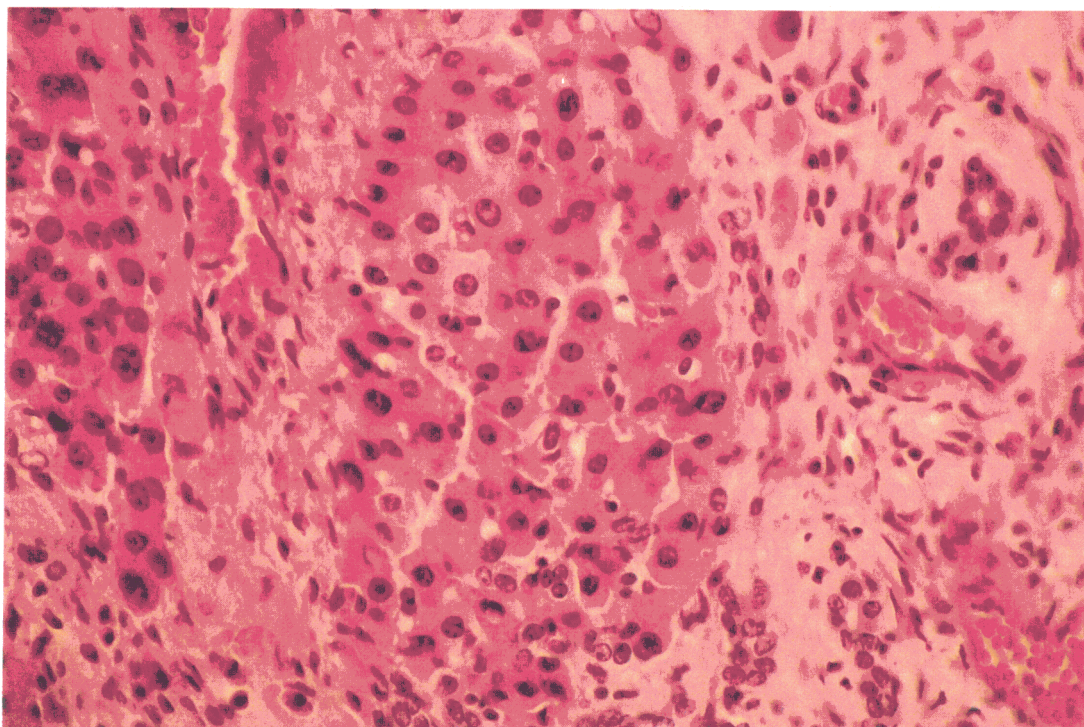


Figura 14. Microfotografía. H.E. 800x. (42 días de colestasis). Hígado cirrótico. Nódulo de regeneración rodeado por fibrosis, infiltrado inflamatorio linfocitario y proliferación ductal.

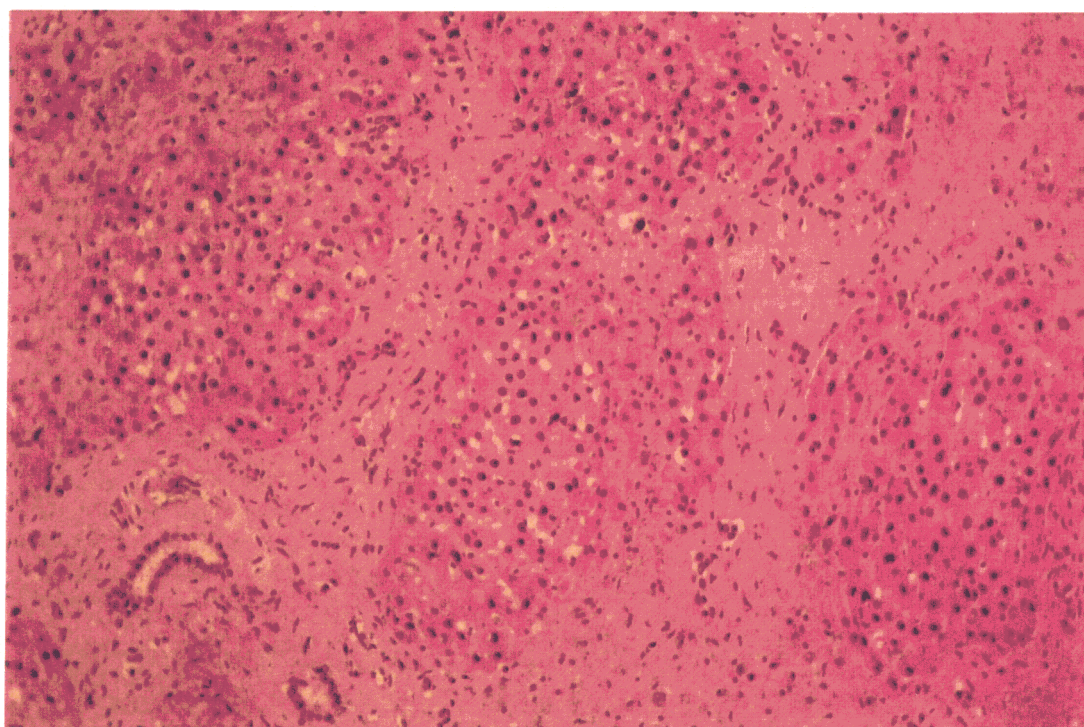


Figura 15. Microfotografía. H.E. 400x. (42 días de colestasis). Cirrosis. Numerosos nódulos de regeneración rodeados por intensa fibrosis. Proliferación ductal e infiltrado inflamatorio de discreta intensidad.

portal y tractos fibrosos intralobulillares e internodulares. El infiltrado periductal ofrecía una imagen de colangitis generalmente discreta. En los casos de colangitis de mayor intensidad, se observaron algunos abscesos intraductales. Los casos que cursaron con mayor hepatonecrosis y fibrogénesis, mostraron además un infiltrado celular predominantemente linfohistiocitario, con algunas células plasmáticas.

IV.4.1.1.2.5. Proliferación de fibroblastos

Los resultados se presentan en la siguiente tabla empleando los signos siguientes: (-) sin proliferación de fibroblastos, (+) discreto grado de proliferación, (++) moderada, y (+++) intensa.

• **Tabla de distribución de frecuencias**

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Proliferación fibroblástica</i>
1	18	-
4	4	-
6	3	+
7	13	+
14	5	++
19	4	++
21	5	+++
22	4	+++
23	7	+++
25	3	+++
26	3	+++
27	3	+++
28	5	+++
30	3	+++
33	7	+++
35	8	+++
42	5	+++

Tabla 21. Proliferación de fibroblastos tras la ligadura y sección del colédoco.

La proliferación de fibroblastos fue paralela a la fibrosis, y algo retrasada respecto a la proliferación ductal. Su presencia, escasa durante la primera semana, se amplió posteriormente, tornándose intensa a los 21 días y manteniéndose en esta forma hasta el final de la experiencia (figura 14).

IV.4.1.1.2.6. Edema portal y hepatocitario

Los resultados ofrecidos en la siguiente tabla se exponen empleando los signos siguientes: (+) discreto grado de edema y (++) moderado.

- Tabla de distribución de frecuencias

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Edema hepatocitario</i>
1	18	+
4	4	++
6	3	++
7	13	++
14	5	++
19	4	++
21	5	++
22	4	+
23	7	+
25	3	+
26	3	+
27	3	+
28	5	+
30	3	+
33	7	+
35	8	+
42	5	+

Tabla 22. Edema portal y hepatocitario tras la ligadura y sección del colédoco.

La edematización celular, en forma de tumefacción celular o degeneración turbia, fue mayor en los días inmediatamente posteriores al proceder quirúrgico, sobre todo en ratas que presentaron muerte espontánea. En general, la edematización celular no fue muy intensa.

IV.4.1.1.2.7. Binucleación hepatocitaria

Los resultados se exponen en la siguiente tabla empleando los signos siguientes:
(+) binucleación poco frecuente y (++) moderada.

- Tabla de distribución de frecuencias

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Binucleación hepatocitaria</i>
1	18	+
4	4	++
6	3	++
7	13	++
14	5	++
19	4	++
21	5	++
22	4	++
23	7	++
25	3	++
26	3	++
27	3	++
28	5	++
30	3	++
33	7	++
35	8	++
42	5	++

Tabla 23. Binucleación hepatocitaria tras la ligadura y sección del colédoco.

La binucleación hepatocitaria es un suceso evidente, aunque no demasiado llamativo, que aumenta a partir de los 4 días de colestasis (figuras 16 y 18). Como se observa en la tabla, las frecuencias encontradas fueron siempre de grado moderado.

IV.4.1.1.2.8. Vacuolización nuclear hepatocitaria

Resultados presentados en la siguiente tabla con los signos siguientes: (-) ausencia de vacuolización nuclear hepatocitaria y (+) discreto grado de vacuolización.

- Tabla de distribución de frecuencias

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Vacuolización nuclear hepatocitaria</i>
1	18	-
4	4	+
6	3	+
7	13	+
14	5	+
19	4	+
21	5	+
22	4	+
23	7	+
25	3	+
26	3	+
27	3	+
28	5	+
30	3	+
33	7	-
35	8	-
42	5	-

Tabla 24. Vacuolización nuclear hepatocitaria tras la ligadura y sección del colédoco.

La vacuolización nuclear hepatocitaria aparece como un hallazgo de escasa intensidad.

IV.4.1.1.2.9. Necrosis hepatocitaria

Los resultados se presentan en la siguiente tabla empleando los signos siguientes: (+) grado discreto de necrosis y (++) moderada.

• Tabla de distribución de frecuencias

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Necrosis hepatocitaria</i>
1	18	+
4	4	++
6	3	++
7	13	++
14	5	++
19	4	++
21	5	++
22	4	++
23	7	++
25	3	++
26	3	++
27	3	++
28	5	++
30	3	++
33	7	++
35	8	++
42	5	++

Tabla 25. Necrosis hepatocitaria tras la ligadura y sección del colédoco.

Las imágenes de necrosis observadas fueron, a partir del 4º día, de moderada intensidad, en un total de 82% de casos (figura 17).

En 7 casos (días 22 y 27 de colestasis) se observaron focos de degeneración

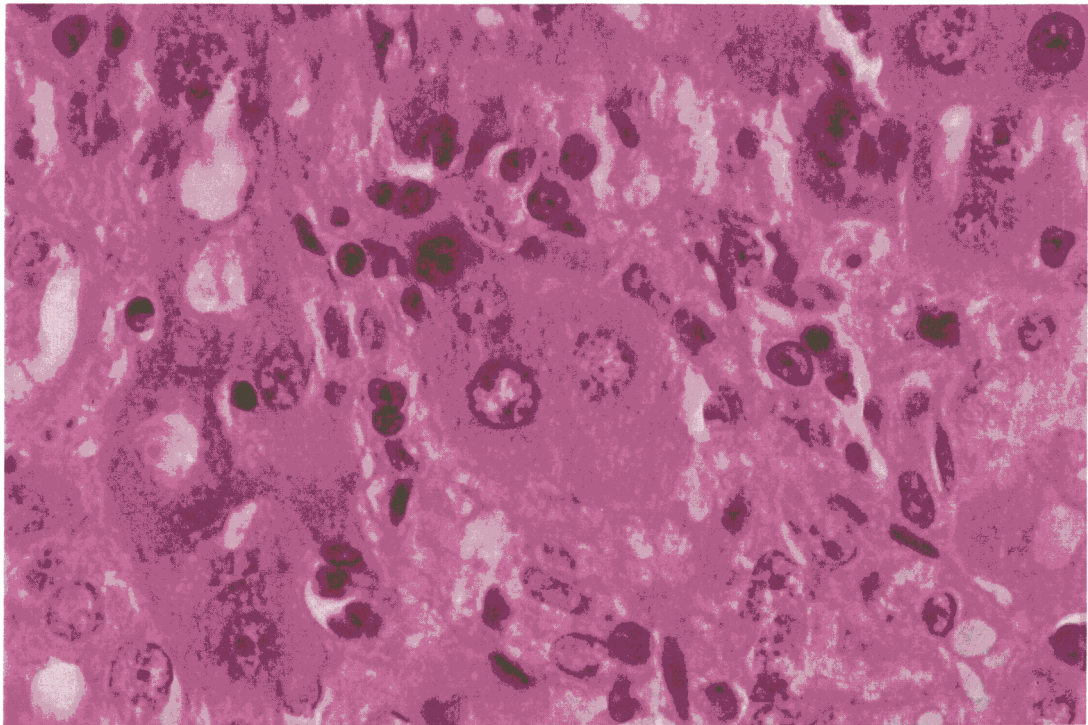


Figura 16. Microfotografía. H.E. 1000x. (27 días de colestasis). Binucleación hepatocitaria –en el centro–. Proliferación de células de von Kupffer.

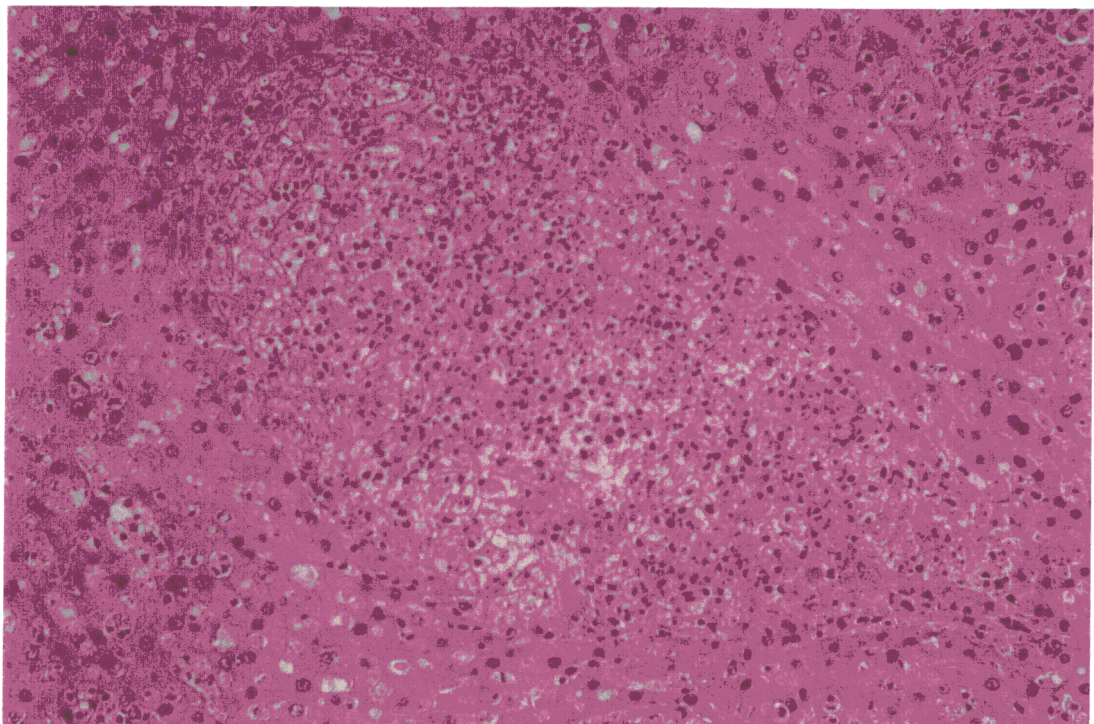


Figura 17. Microfotografía. H.E. 600x. (30 días de colestasis). Necrosis hepatocitaria –infarto biliar– mostrando infiltrado inflamatorio linfohistiocitario y proliferación ductal.

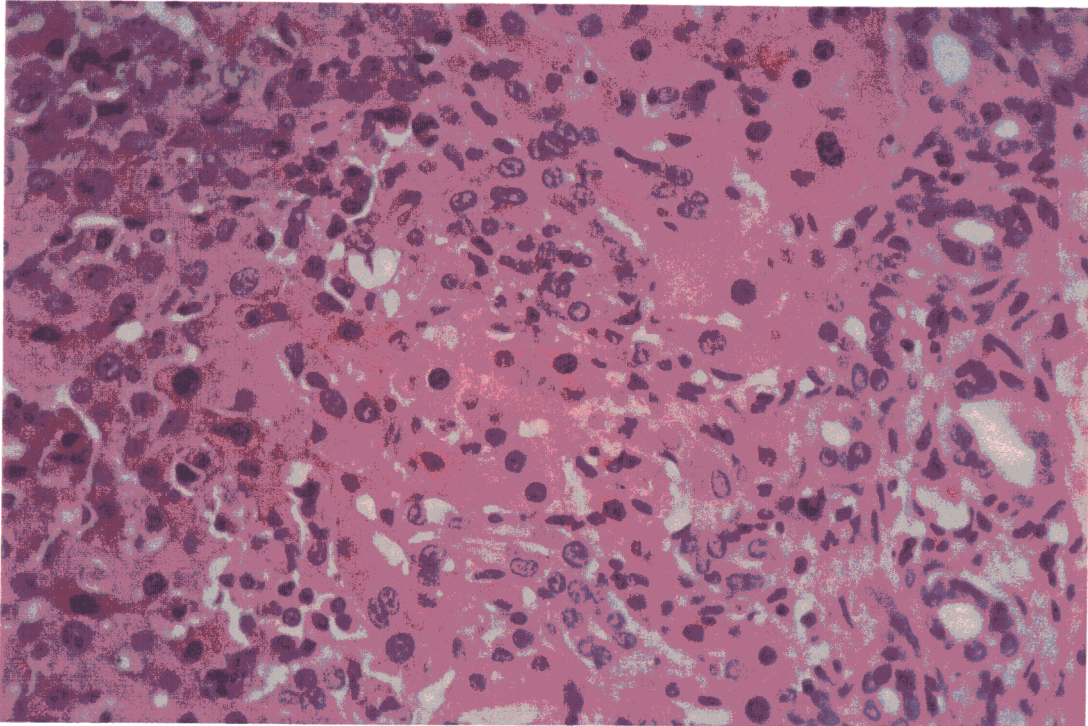


Figura 18. Microfotografía. H.E. 800x. (25 días de colestasis). Hepatocitos rodeados por infiltrado inflamatorio, proliferación ductal y de células de von Kupffer.

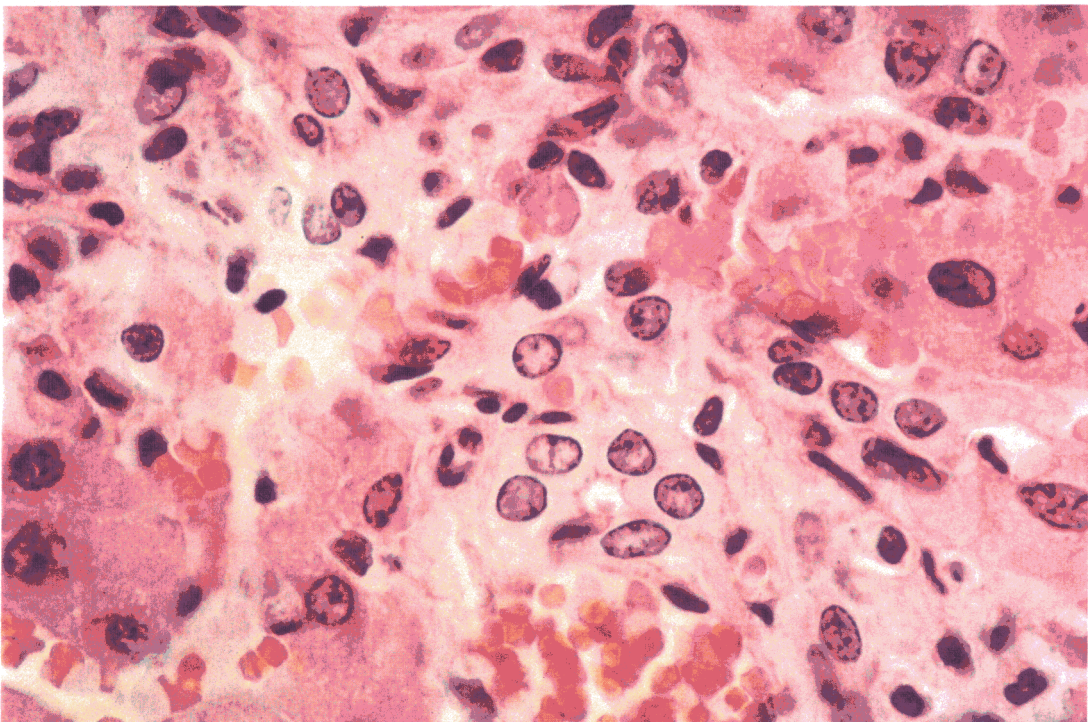


Figura 19. Microfotografía. H.E. 1000x. (33 días de colestasis). Proliferación ductal y de células de von Kupffer, rodeando hepatocitos.

plumosa hepatocelular o de infarto biliar periportal, con similitud morfológica a los observables en los procesos patológicos humanos ocasionados por la obstrucción biliar extrahepática o de los grandes ductos.

Se puede decir que, en general, la necrosis hepatocitaria alcanzó mayor entidad cuando la fibrosis perinodular fue más intensa (en 26 casos).

Aunque de modo esporádico, se vieron necrosis hialinas similares a cuerpos de Mallory y hepatocitos con necrosis eosinofílica.

IV.4.1.1.2.10. Proliferación de células de Von Kupffer

Los resultados se presentan a continuación en la siguiente tabla empleando los signos siguientes: (-) ausencia de proliferación de células de Kupffer, (+) grado discreto de proliferación, (++) moderada, y (+++) intensa.

• Tabla de distribución de frecuencias

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Proliferación de células de Kupffer</i>
1	18	-
4	4	-
6	3	+
7	13	+
14	5	++
19	4	++
21	5	+++
22	4	+++
23	7	+++
25	3	+++
26	3	+++
27	3	+++
28	5	+++
30	3	+++
33	7	+++
35	8	+++
42	5	+++

Tabla 26. Proliferación de células de Kupffer tras la ligadura y sección del colédoco.

El incremento tisular de células de Kupffer se puso de manifiesto a partir de los 6 días, aumentando progresivamente su presencia a los 21 días en que alcanza el máximo y que se mantiene hasta el fin de la experiencia.

Se advirtió la aparición de hipertrofia y de hiperplasia de estas células reticuloendoteliales –sistema macrofágico mononuclear– (figuras 16, 18 y 19).

IV.4.1.1.2.11. Estructura lobulillar

La tabla que se presenta a continuación se refiere a la conservación o alteración de la arquitectura del lobulillo hepático.

- Tabla de distribución de frecuencias

<i>Días de colestasis</i>	<i>CASOS</i>	<i>Estructura lobulillar</i>
1	18	Conservada
4	4	Conservada
6	3	Conservada
7	13	Conservada
14	5	Alterada
19	4	Alterada
21	5	Alterada
22	4	Alterada
23	7	Alterada
25	3	Alterada
26	3	Alterada
27	3	Alterada
28	5	Alterada
30	3	Alterada
33	7	Alterada
35	8	Alterada
42	5	Alterada

Tabla 27. Estructura lobulillar tras la ligadura y sección del colédoco.

La estructura del lobulillo hepático se conservó durante los 7 primeros días. A partir de la segunda semana, y hasta el final de la experiencia, la arquitectura hepática se mostró alterada. Esta transformación fue más acusada en los individuos con cirrosis (figuras 14 y 15).

IV.4.1.2. Colédoco**IV.4.1.2.1. Examen macroscópico**

En general, tanto en las ratas sacrificadas semanalmente como en las muertas de forma espontánea, se observaron los colédocos muy dilatados, tanto más cuanto mayor fue el tiempo de obstrucción (figuras 20 y 21).

La mejor forma de evaluar su tamaño es midiendo su contenido. Estos resultados se reflejan y comentan en el apartado IV.4.2.2.3.1.

IV.4.1.2.2. Examen microscópico

Las paredes del colédoco mostraron, en general, una mucosa denudada con necrosis celular. Al igual que el contenido luminal, la pared del colédoco, en todos los especímenes, presentó un infiltrado inflamatorio agudo leucocitario polimorfonuclear neutrofílico, sobre todo en la superficie luminal, e infiltración de predominio fibro-histio-linfocitaria a nivel intraparietal a partir de los 7 días, lo que corresponde a una inflamación mixta –crónica y aguda–.

La serosa mostró grados variables de fibrosis (figura 22).

IV.4.1.2.3. Contenido biliar**IV.4.1.2.3.1. Examen macroscópico del contenido biliar**

Provocada la colestasis el contenido biliar era de color verdoso, unas veces fluido, otras como barro biliar. Con cierta frecuencia se observó, sobre todo a partir de 28 días de colestasis, un contenido grisáceo e incluso seroso.

- Matriz de datos.

La cantidad – en ml– de bilis viene expresada, en la tabla, como media aritmética (desviación estándar), \bar{x} (DE).

	<i>Días de colestasis extrahepática</i>						
	Control	7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	0,1(0,0)	0,9(0,1)	1,8(0,2)	2,4(0,2)	3,5(2,2)	13(4,8)	19(9,1)

Tabla 28. Contenido biliar en el colédoco (ml) tras la ligadura y sección del colédoco.

- Análisis de la variancia (ANOVA)

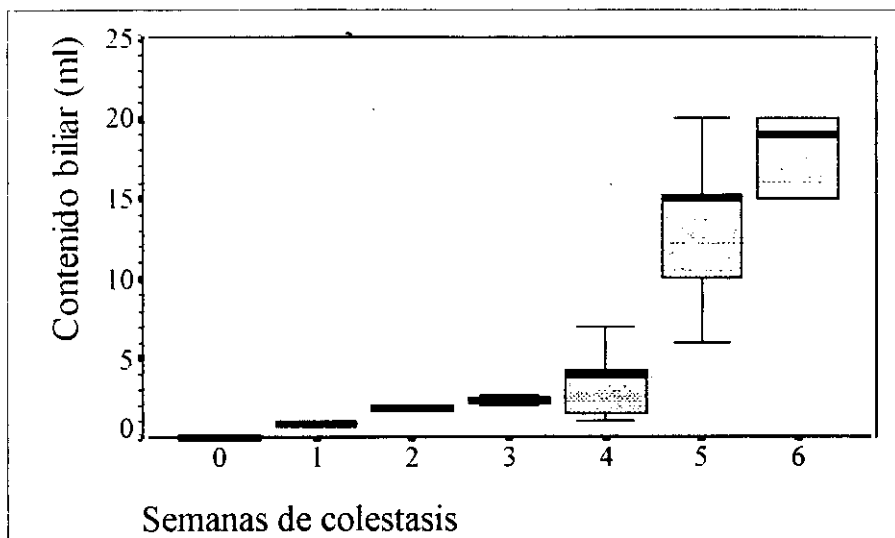
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medias cuadráticas</i>	<i>F de Snedecor</i>
Entre grupos	1762,1057	6	293,6843	17,4519
Residual	555,3320	33	16,8282	p=0,0000
Total	2317,4377	39		

- Coeficiente η^2
 $\eta^2 = 0,7604$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa).

		<i>SEMANAS</i>						
Media arit.	Grupos	0	1	2	3	4	5	6
0,10	0							
0,94	1							
1,80	2							
2,38	3							
3,54	4							
13,20	5	*	*	*	*	*		
19,20	6	*	*	*	*	*		

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

La colestasis provoca acúmulo de fluido biliar dentro del colédoco proximal ligado ($F=17,4419$; $p=0,0000$). Se calcula en un 76% la participación que tiene la obturación del flujo biliar en la cantidad de bilis almacenada, mientras que el resto se debe a la variabilidad de los individuos.

De la observación del diagrama de cajas y con los resultados del test de Bonferroni, se puede concluir que se produce un incremento exponencial desde el momento de la obstrucción, que no se hace significativo hasta la 5ª y 6ª semanas.

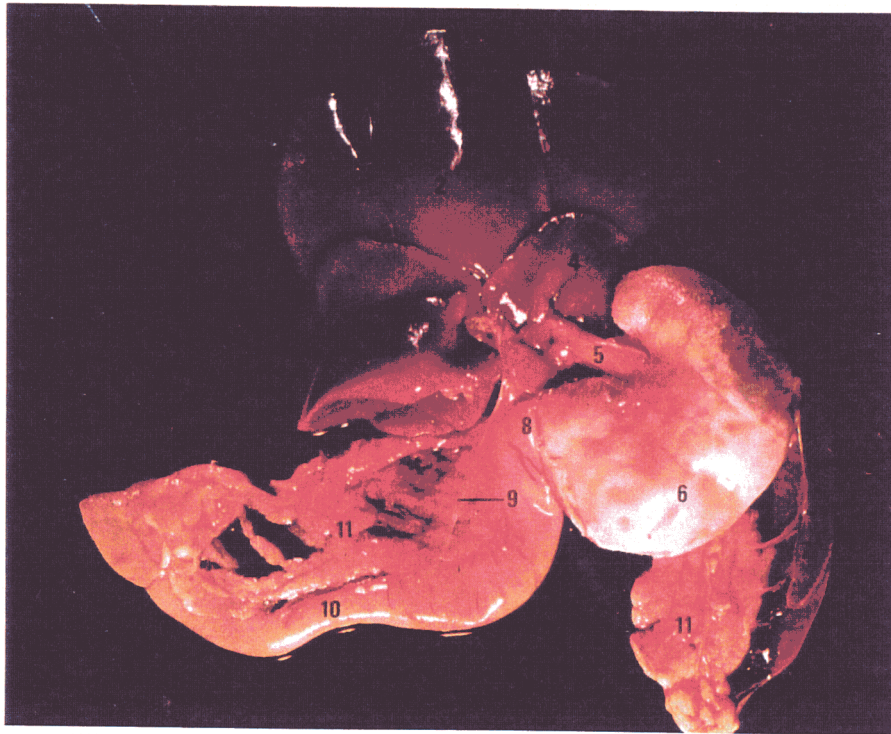


Figura 20. Imagen macroscópica. El colédoco en la rata (9). Fotografía tomada de RJ Olds, Jr Olds. A colour atlas of the rat. Dissection guide. Wolfe medical publications Ltd.; 1979: 49.



Figura 21. Imagen macroscópica. (42 días de colestasis). Notable dilatación y aumento de tamaño del colédoco por colestasis.

IV.4.1.2.3.2. Examen microscópico del contenido biliar

El contenido del conducto biliar hipertrofiado estaba formado por bilis y por un infiltrado celular purulento de tipo leucocitario polimorfonuclear neutrofilico; en otros casos, por fluido seroso transparente con escasos elementos inflamatorios –hidrops coledociano–.

IV.4.1.3. Bazo**IV.4.1.3.1. Observaciones macroscópicas**

Los bazos estudiados, procedentes de las ratas sacrificadas semanalmente y de las muertas espontáneamente, tenían aspecto congestivo.

IV.4.1.3.2. Observaciones microscópicas

Se confirmaron los hallazgos macroscópicos de congestión vascular, en todos los casos (figura 23).

IV.4.1.4. Riñones**IV.4.1.4.1. Observaciones macroscópicas**

- Tabla de distribución de frecuencias

<i>Días</i>	<i>Ratas sacrificadas</i>	<i>Ratas muertas espontáneamente</i>	<i>Exámen macroscópico renal</i>
1	-	18	Congestivos
4	-	4	Congestivos
6	-	3	Congestivos
7	5	8	Congestivos
14	5	-	Congestivos
19	-	4	Congestivos
21	5	-	Congestivos
22	-	4	Congestivos
23	-	7	Congestivos
25	-	3	Congestivos
26	-	3	Congestivos
27	-	3	Congestivos
28	5	-	Congestivos
30	-	3	Congestivos
33	-	7	Congestivos
35	5	3	Congestivos
42	5	-	Congestivos
Total	30	70	

Tabla 29. Examen macroscópico renal de las ratas sacrificadas y de las muertas de forma espontánea.

La tabla muestra cómo la congestión vascular renal fue una constante en los casos estudiados.

IV.4.1.4.2. Observaciones microscópicas

- Tabla de distribución de frecuencias

Nota: la abreviatura: N.T.A.I., corresponde a necrosis tubular aguda isquémica;

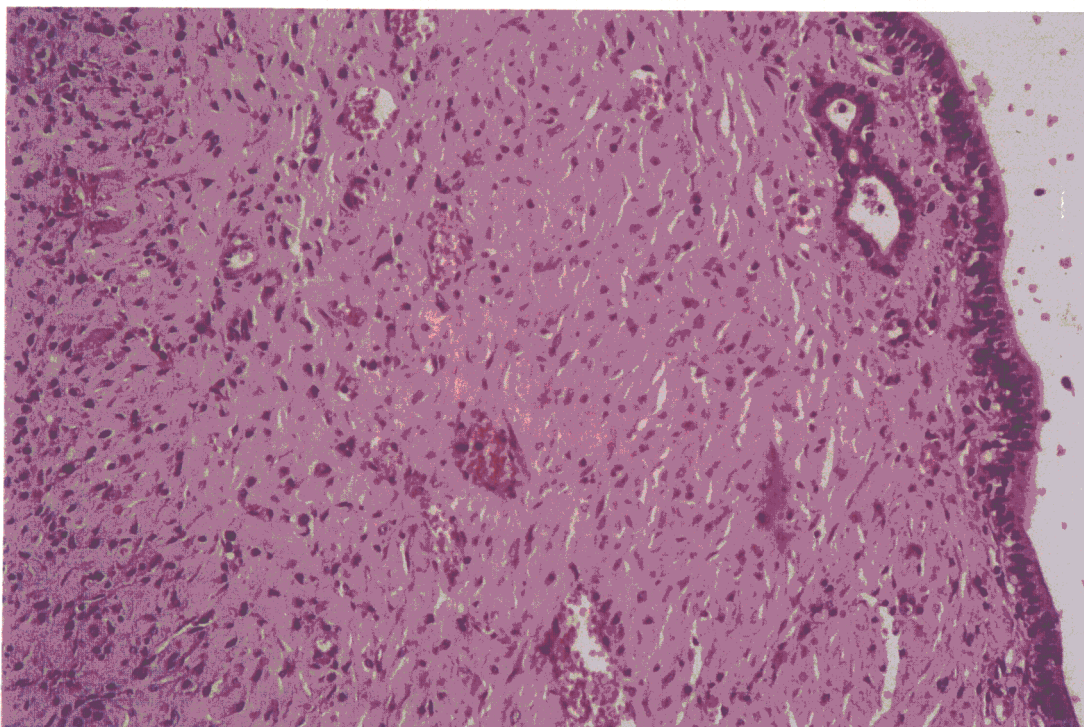


Figura 22. Microfotografía. H.E. 250x. (21 días de colestasis). Pared del colédoco dilatada. La superficie luminal muestra células cilíndricas mucosecretoras. El resto corresponde a pared fibrosada, con proliferación vascular e infiltrado inflamatorio linfohistiocitario.

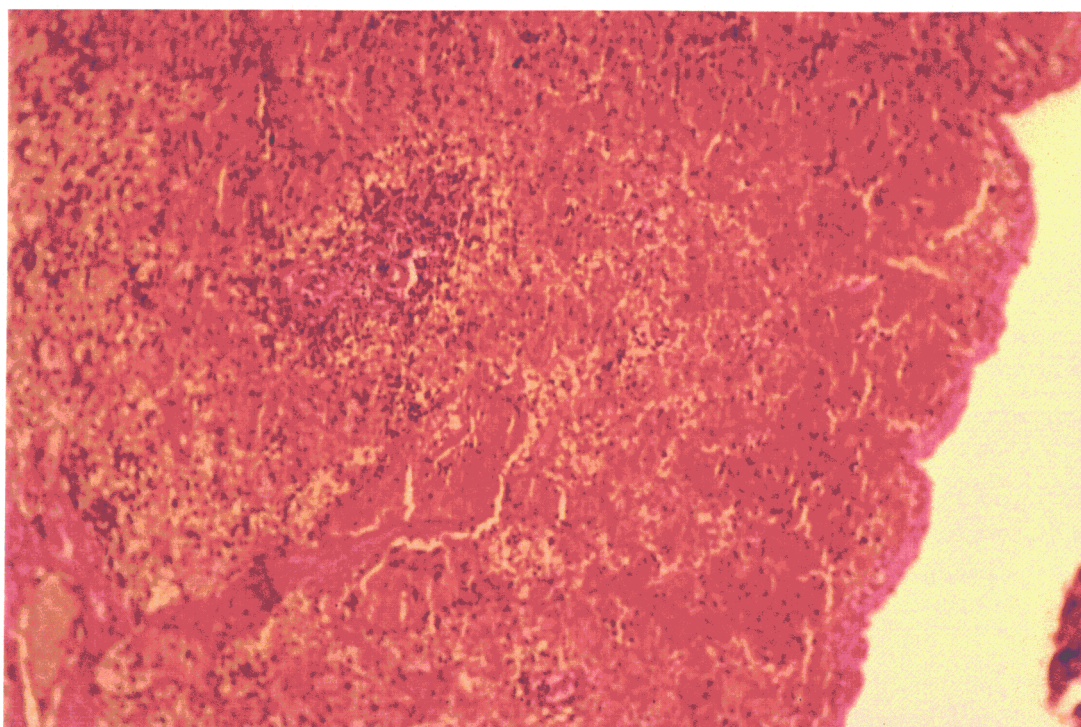


Figura 23. Microfotografía. H.E. 200x. (28 días de colestasis). Bazo mostrando gran congestión vascular de la pulpa roja.

N.C.A.I. a necrosis cortical aguda isquémica; y Cong. vasc. a congestión vascular.

<i>Días</i>	<i>Ratas sacrificadas</i>	<i>Ratas muertas espontáneamente</i>	<i>Exámen microscópico renal</i>
1	-	18	N.T.A.I.(18)
4	-	4	N.T.A.I.(4)
6	-	3	N.T.A.I.(6)
7	5	8	Cong. vasc.(5)/N.T.A.I.(8)
14	5	-	Cong. vasc.(5)
19	-	4	N.T.A.I.(4)
21	5	-	Cong. vasc.(5)/N.T.A.I.(2)
22	-	4	N.T.A.I.(4)
23	-	7	N.C.A.I.(7)
25	-	3	N.C.A.I.(3)
26	-	3	N.C.A.I.(3)
27	-	3	N.C.A.I.(3)
28	5	-	Cong. vasc.(5)/N.T.A.I.(3)
30	-	3	N.C.A.I.(3)
33	-	7	N.C.A.I.(7)
35	5	3	Cong. vasc.(5)/N.C.A.I.(2)
42	5	-	Cong. vasc.(5)/N.C.A.I.(3)

Tabla 30. Examen microscópico renal de las ratas sacrificadas y de las muertas de forma espontánea de la serie de evolución patológica.

Las ratas muertas espontáneamente presentaron, en su totalidad, la morfología renal de necrosis tubular isquémica, aunque en diversos estadios. Sin embargo, la constante morfológica de las ratas sacrificadas en intervalos semanales fue de congestión vascular. Esta imagen coexistía con áreas de necrosis tubular, tanto más frecuentes y acusadas cuanto más prolongado fue el tiempo de colestasis (figura 24).

IV.4.1.5. Pulmones

IV.4.1.5.1. Observaciones macroscópicas

En la totalidad de los pulmones estudiados se apreció un estado de congestión vascular intensa, como después se confirmó en la observación microscópica (figura 25). 63, de los 70 casos en los que se produjo muerte espontánea, presentaban un aspecto de hepatización roja y edema agudo de pulmón (E.A.P.). En los pulmones de estas mismas ratas manaba, al presionar la superficie de corte, líquido seroprotéico con gas.

IV.4.1.5.2. Observaciones microscópicas

• Tabla de distribución de frecuencias.

Nota: las abreviaturas empleadas en la tabla corresponden a: E.A.P. a edema agudo de pulmón; Atel. a atelectasia; Bronconeum. a bronconeumonía.

Los números entre paréntesis indican la cantidad de casos con la circunstancia que les precede.

<i>Días</i>	<i>Ratas sacrificadas</i>	<i>Ratas muertas espontáneamente</i>	<i>Exámen microscópico pulmonar</i>
1	-	18	E.A.P.(14) Bronconeumonía (18)
4	-	4	Bronconeumonía (4)
6	-	3	Bronconeumonía (3)
7	5	8	E.A.P. (6)/bronconeum (7)
14	5	-	Bronconeumonía (5)
19	-	4	Bronconeum.(4)/Atel.(4)/ Enfisema (4)
21	5	-	E.A.P (5)/bronconeum (5)
22	-	4	E.A.P (4)/bronconeum (4)
23	-	7	E.A.P (7)/bronconeum (7)
25	-	3	E.A.P (3)/bronconeum (3)
26	-	3	Bronconeum.(3)/Atel.(3)/ Enfisema (3)
27	-	3	Bronconeumonía (3)
28	5	-	Bronconeumonía (5)
30	-	3	Bronconeumonía (3)
33	-	7	E.A.P. (7)/bronconeum (7)
35	5	3	E.A.P.(8)/bronconeum (8)
42	5	-	E.A.P. (5)/bronconeum (5)
Total	30	70	

Tabla 31. Examen microscópico pulmonar de las ratas sacrificadas y de las muertas de forma espontánea de la serie de evolución patológica.

Se observó un total de 94 casos de bronconeumonía de diversa consideración, 39 de ellos asociados a un edema agudo de pulmón (E.A.P.) (figura 26) y 7 a atelectasia y enfisema.

IV.4.1.6. Derrames hemáticos: peritoneales, torácicos y en luz intestinal

En el momento de realizar la necropsia se prestó especial atención a la presencia de derrames hemáticos en las cavidades peritoneal y torácica, y en el interior del tubo digestivo.

En la siguiente tabla se exponen únicamente los resultados obtenidos en las ratas muertas de forma espontánea ya que, en las sacrificadas, no se encontraron derrames.

• Tabla de distribución de frecuencias.

<i>Días</i>	<i>CASOS</i>	<i>Derrames hemáticos</i>		
		Peritoneales	Torácicos	Luz intestinal
1	18	7	10	-
4	4	4	-	-
6	3	3	3	-
7	8	8	-	-
19	4	-	-	-
22	4	-	-	-
23	7	-	-	2
25	3	-	-	-
26	3	-	-	-
27	3	-	-	1
30	3	-	-	-
33	7	-	-	-
35	3	-	-	-
Total	70	22	13	3

Tabla 32. Presencia de derrames hemáticos peritoneales, torácicos y en el interior del tubo digestivo en ratas muertas de forma espontánea.

Solo se encontraron derrames hemáticos en cavidad peritoneal durante la primera

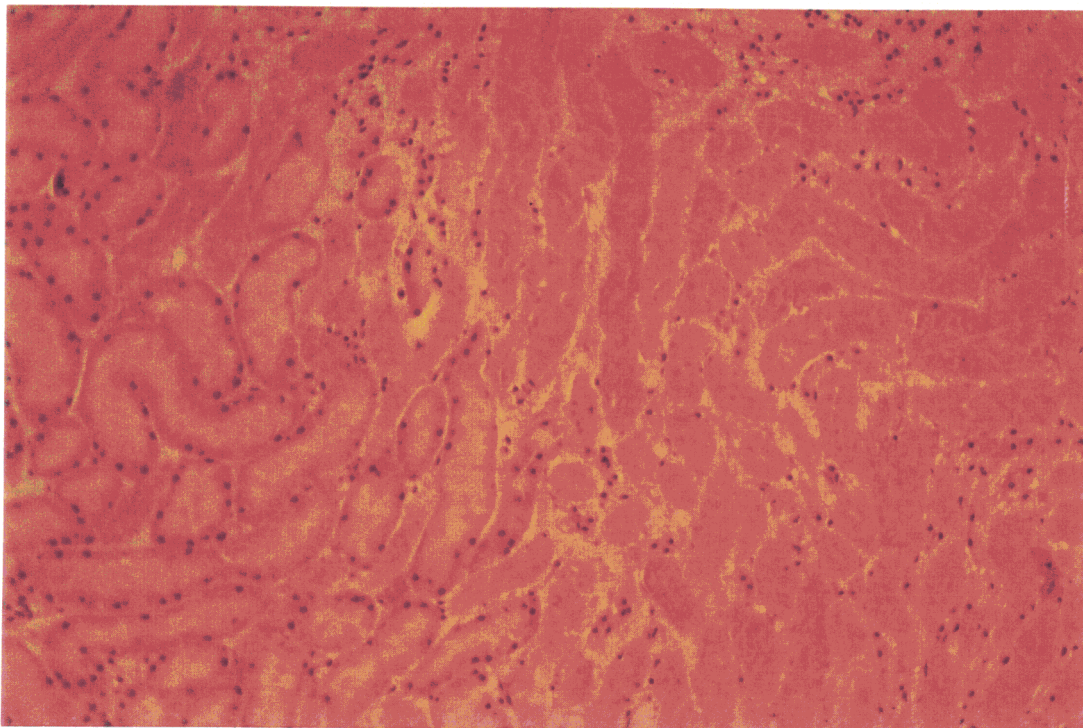


Figura 24. Microfotografía. H.E. 200x. (22 días de colestasis). Riñón con una necrosis tubular aguda –derecha–.

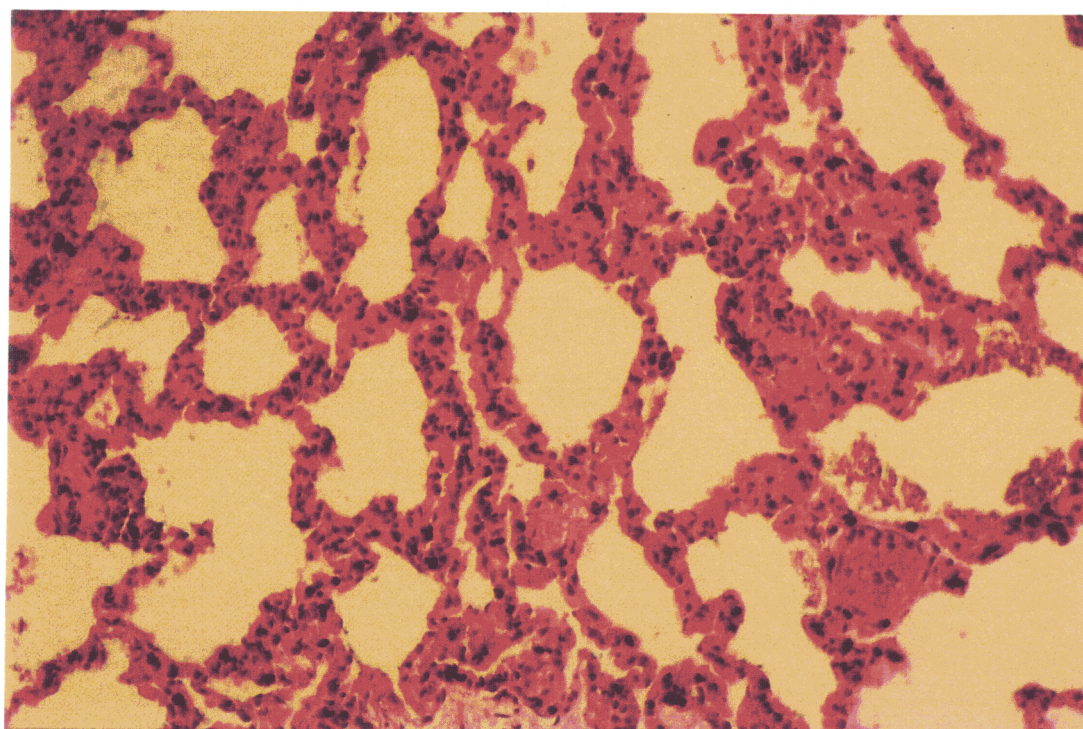


Figura 25. Microfotografía. H.E. 200x. (42 días de colestasis). Parénquima pulmonar con congestión vascular a nivel de los tabiques interalveolares.

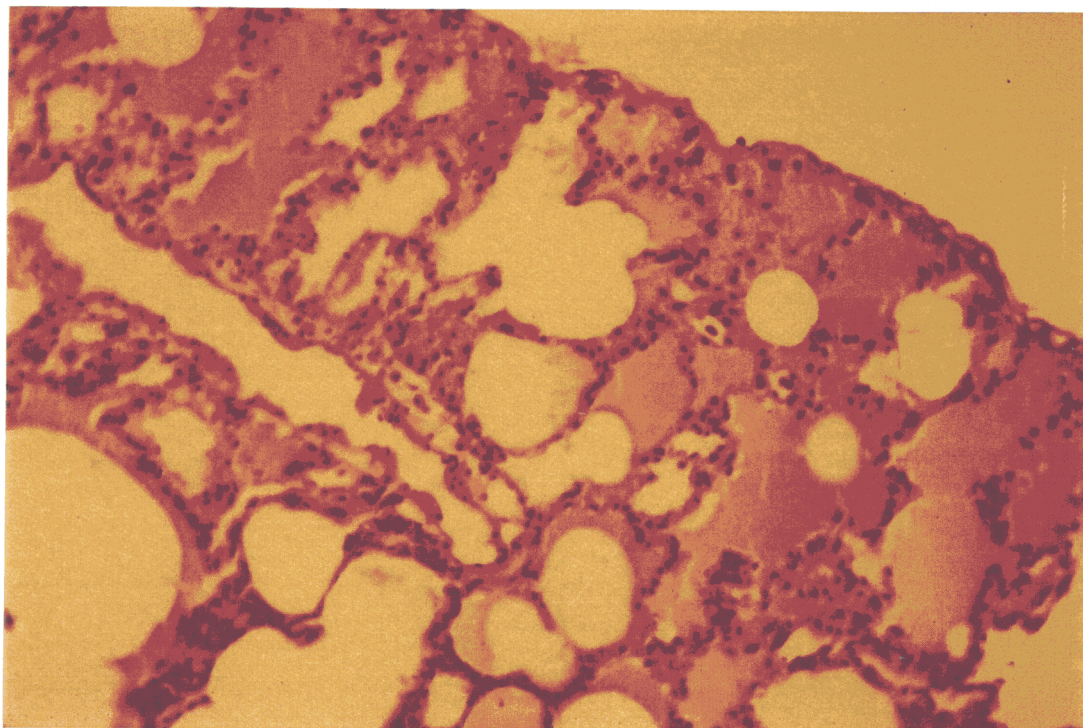


Figura 26. Microfotografía. H.E. 200x. (42 días de colestasis). Área pulmonar subpleural con edema agudo de pulmón (E.A.P.).

semana de colestasis extrahepática. De las 18 ratas muertas de forma espontánea al transcurrir 24 horas de colestasis, poco menos de la mitad (7) mostraban hemorragias en cavidad abdominal. En los días que completaban la semana, todos los casos de muerte espontánea presentaron derrames en cavidad abdominal.

Los derrames hemáticos en cavidad torácica se hicieron patentes en 10 de las 18 ratas muertas de forma espontánea tras 24 horas de ligadura; y en todos los casos producidos a los 6 días. Durante el resto del experimento no hubo ningún nuevo caso de derrame intratorácico.

La situación de hemorragia digestiva fue de menor entidad; aparecieron 2 casos a los 23 días de colestasis y 1 a los 27.

IV.4.2. Constantes sanguíneas

En el presente apartado se presentan los resultados del análisis de las constantes sanguíneas en la serie de evolución patológica. De igual manera se realiza el estudio estadístico correspondiente para evidenciar la existencia, o no, de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que componen la experiencia.

Dado el tamaño de la muestra de cada grupo, y previo a cualquier procedimiento estadístico, los datos fueron sometidos a exploración para comprobar la no-vulneración del principio de normalidad (test de Shapiro-Wilks), así como la homogeneidad de sus variancias (test de Levene), encaminado a garantizar la veracidad de las conclusiones de los distintos estimativos estadísticos.

IV.4.2.1. Bioquímica sérica

Integran este apartado los capítulos que a continuación se relacionan.

IV.4.2.1.1. Alteraciones enzimáticas

Los resultados fueron sometidos a los estimadores estadísticos enunciados en el apartado III.2.6.2.5

IV.4.2.1.1.1. Creatin fosfo kinasa (CPK)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

Esta actividad enzimática se expresa en unidades internacionales por litro (U/l).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	184(33)	1235(1092)	316(48)	205(75)	311(47)	162(3)	135(28)

Tabla 33. Evolución semanal de la creatin fosfo kinasa (U/l)

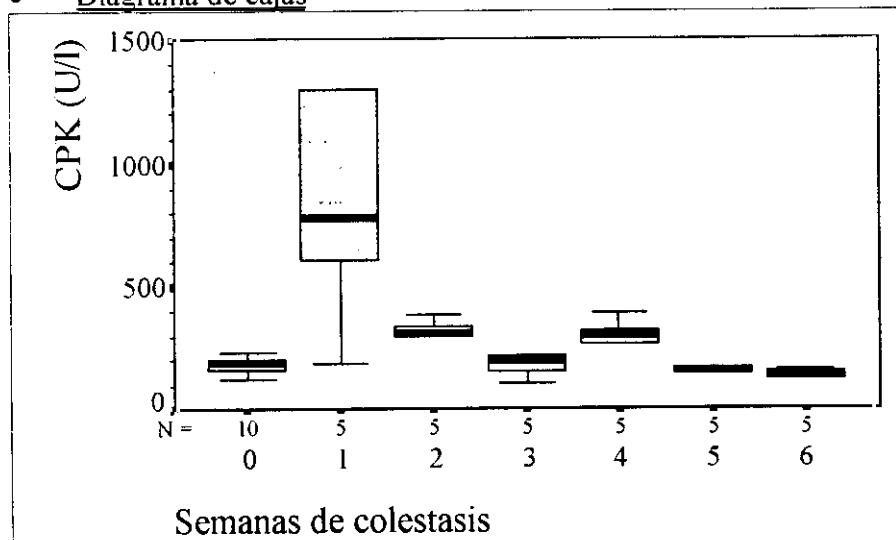
- **Test de Kruskal-Wallis**

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
26,6239	6	p=0,0002

- **Comparaciones múltiples:** procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	<i>SEMANAS</i>						
		6	5	0	3	4	2	1
135,4	6							
161,8	5							
184,1	0							
204,6	3							
311,4	4							
316,2	2							
1235,2	1	*	*	*	*	*	*	

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

El análisis de Kruskal-Wallis pone de manifiesto la existencia de una relación estadísticamente significativa ($\chi^2=26,6239$; $p=0,0002$) entre el tiempo de colestasis quirúrgica y la actividad sérica creatin fosfo quinasa. Al examinar los resultados del test de Bonferroni y el diagrama de cajas, se observa que el único grupo de datos responsable de la variación corresponde a la primera semana de colestasis.

Mediante el t-test de Student Fischer de comparación de medias, se demostró la ausencia de diferencia estadísticamente significativa ($t=1,59$; $p=0,186$) entre la operación simulada y 1 semana de colestasis; y sí entre las CPK control *versus* la correspondiente del grupo de operación simulada ($t=3,29$; $p=0,008$).

Las restantes valoraciones semanales de la actividad CPK, al compararse entre sí (test de Bonferroni), no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$).

IV.4.2.1.1.2. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

		<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
	Control	7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	3(1)	34(16)	23(2)	34(7)	89(29)	61(24)	44(13)

Tabla 34. Evolución semanal de la gamma glutamil transpeptidasa (U/l)

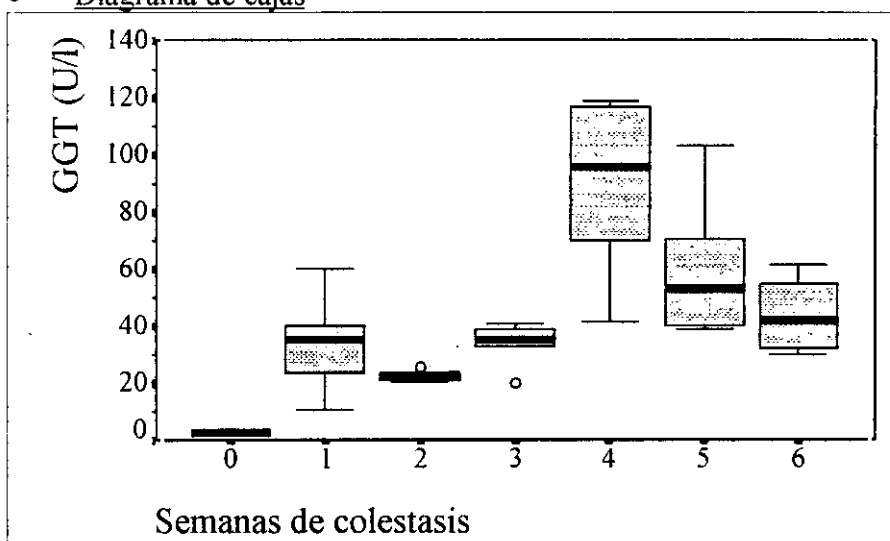
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
32,3286	6	0,0000

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		SEMANAS							
Media arit.	Grupos	0	2	3	1	6	5	4	
2,9	0								
22,6	2								
33,6	3								
34,0	1	*							
44,2	6	*							
61,2	5	*	*						
88,8	4	*	*	*	*	*			

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

Durante las 6 semanas de colestasis experimental se produjo una variación significativa ($\chi^2=32,3286$; $p=0,0000$) de la actividad de la GGT.

La lectura del test de Bonferroni y el diagrama de cajas ponen de manifiesto:

- un aumento significativo de la actividad enzimática a la semana de colestasis,
- que en las 2 semanas siguientes la actividad GGT mantiene valores semejantes a los correspondientes al grupo control,
- que es en la semana 4ª cuando se produce un nuevo incremento significativo respecto de los valores control, que se mantiene en la siguiente para experimentar un decremento significativo en la última.

IV.4.2.1.1.3. Aspártico transaminasa (AST)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	Días de colestasis extrahepática					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	97(9)	432(167)	183(19)	458(75)	608(168)	456(184)	442(149)

Tabla 35 Evolución semanal de la aspártico transaminasa (U/l)

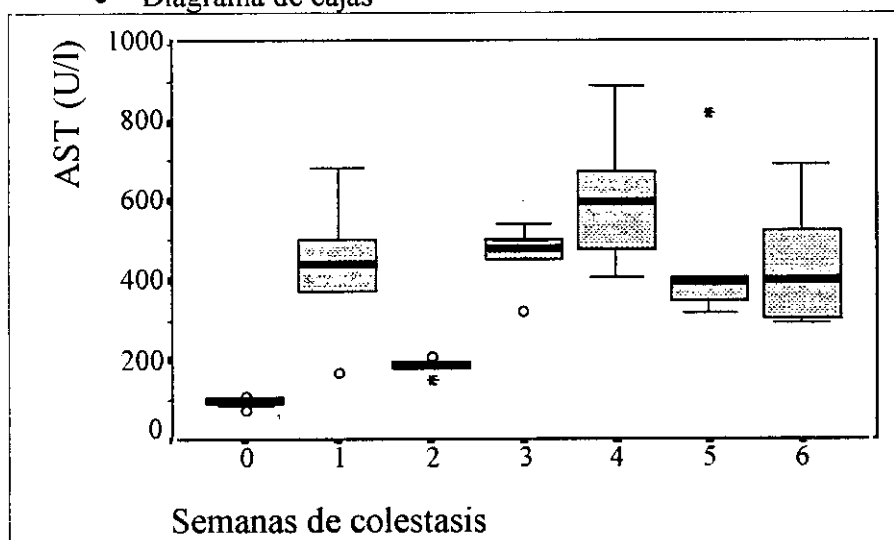
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
29,5213	6	0,0000

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	SEMANAS							
		0	2	1	6	5	3	4	
97,1	0								
183,0	2								
431,8	1	*							
442,4	6	*							
456,4	5	*							
458,0	3	*							
608,0	4	*	*						

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

La colestasis afecta significativamente ($\chi^2=29,5213$; $p=0,0000$) a la actividad aspártico transaminasa.

De la realización del test de Bonferroni –contrastes múltiples–, y de la observación del gráfico de cajas se puede deducir:

- aumento de actividad AST en la primera semana de colestasis. Para verificar si ello era o no debido a la colestasis se realiza un t-test entre la actividad AST de la serie de operación simulada y el lote control, poniéndose de manifiesto, diferencias no significativas ($t=1,71$; $p=0,119$).

Si la comparación de medias se efectúa entre la serie de operación simulada y el grupo de individuos con 1 semana de colestasis, sí se presenta una diferencia estadísticamente significativa ($t=3,6$; $p=0,02$),

- a partir de la 3ª semana se produce un nuevo aumento de AST, respecto a los valores basales que se mantiene estadísticamente sin diferencias ($p>0,05$), hasta el final de la experiencia.

IV.4.2.1.1.4. Alanin transaminasa (ALT)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como

medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

		<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
	Control	7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	57(7)	182(91)	60(16)	173(58)	198(70)	133(59)	137(52)

Tabla 36 Evolución semanal de la alanin transaminasa (U/l)

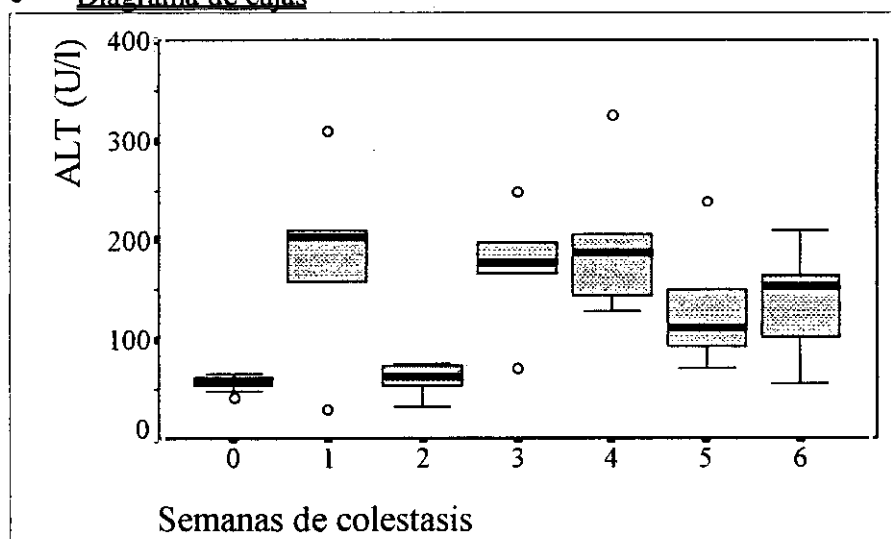
• **Test de Kruskal-Wallis**

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
21,0860	6	0,0018

- **Comparaciones múltiples:** procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	<i>SEMANAS</i>							
		0	2	5	6	3	1	4	
57,4	0								
59,8	2								
133,2	5								
137,2	6								
172,6	3	*							
182,0	1	*							
198,4	4	*	*						

• **Diagrama de cajas**



• **Inferencia estadística**

La ligadura y sección del colédoco afecta significativamente ($\chi^2=21,0860$; $p=0,0018$) a los niveles de alanin transaminasa.

Respecto de los valores correspondientes al grupo control se producen dos situaciones de aumento significativo de esta actividad enzimática:

- en la primera semana, para descender en la siguiente. Realizado el correspondiente t-test entre el grupo control y el de operación simulada se ponen de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($t=3,27$; $p=0,004$); si la comparación se realiza entre el grupo de operación simulada y el compuesto por los individuos sometidos a 1 semana de colestasis esta diferencia de medias, aunque menor, sigue siendo

significativa ($t=3,05$; $p=0,037$),

- En la 3ª semana y que se mantiene durante la siguiente en condiciones semejantes, para en las 2 últimas semanas decrecer significativamente a niveles comparables con los del grupo control.

IV.4.2.1.1.5. Láctico deshidrogenasa (LDH)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	212(67)	350(102)	268(71)	294(108)	697(192)	583(212)	390(39)

Tabla 37 Evolución semanal de la láctico deshidrogenasa (U/l)

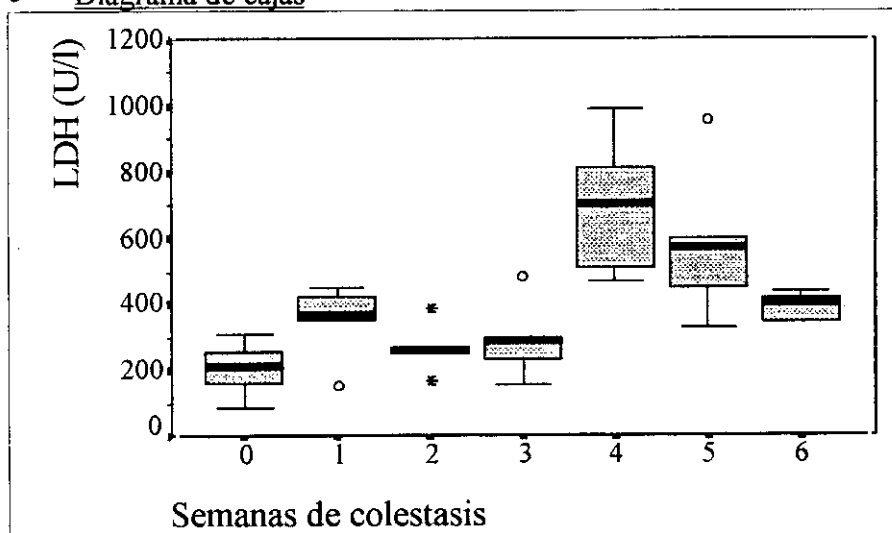
- Análisis de la variancia (ANOVA)

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medias cuadráticas</i>	<i>F de Snedecor</i>
Entre grupos	1092376,000	6	182062,6667	10,0369
Residual	598595,6000	33	18139,2606	$p=0,0000$
Total	1690971,600	39		

- Coefficiente η^2
 $\eta^2 = 0,6460$
- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa).

		<i>SEMANAS</i>							
Media arit.	Grupos	0	2	3	1	6	5	4	
212,4	0								
268,2	2								
294,4	3								
349,6	1								
390,4	6								
583,0	5	*	*	*					
696,8	4	*	*	*	*	*			

- Diagrama de cajas



- Inferecia estadística

Existe una relación significativa entre la actividad enzimática lactato deshidrogenasa y el tiempo de colestasis ($F=10,0369$; $p=0,0000$). El grado de responsabilidad de esta última en la variación es del 64,6%.

Los niveles séricos de LDH permanecen durante las 3 primeras semanas con valores semejantes a los correspondientes a los controles. En la 4ª semana se detecta un aumento de la actividad enzimática, que se mantiene en la 5ª, para iniciar en la última un decremento hasta alcanzar valores basales.

IV.4.2.1.1.6. Fosfatasa alcalina (AP)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	258(49)	300(49)	540(79)	535(64)	569(133)	565(65)	669(197)

Tabla 38. Evolución semanal de la fosfatasa alcalina (U/l)

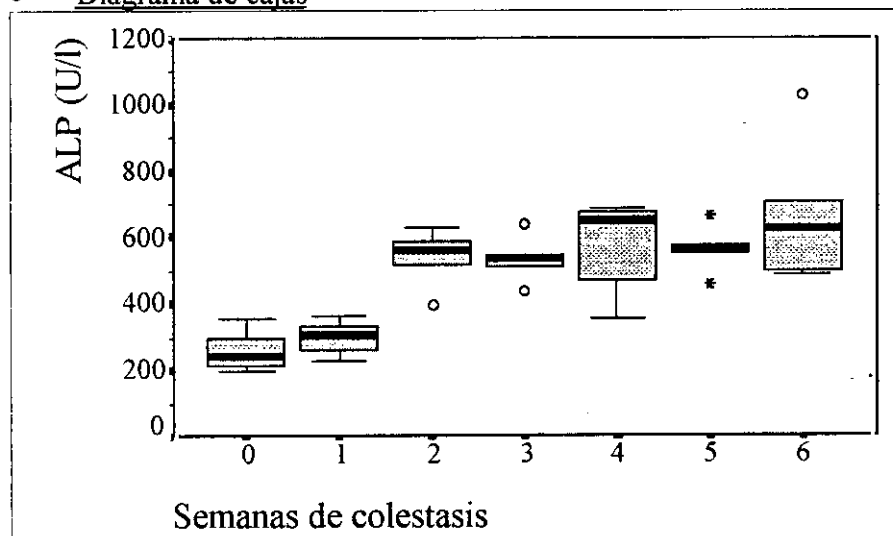
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
28,0803	6	0,0001

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	<i>SEMANAS</i>							
		0	1	3	2	5	4	6	
257,7	0								
300,2	1								
535,4	3	*	*						
539,6	2	*	*						
565,2	5	*	*						
569,2	4	*	*						
669,4	6	*	*						

- Diagrama de cajas



- Inferecia estadística

La colestasis produce un incremento significativo ($\chi^2=28,0803$; $p=0,0001$) de la

actividad sérica fosfatasa alcalina.

Tras 2 semanas de colestasis se produce un incremento comprendido entre 2 y 3 veces los valores basales. Con estos niveles se alcanza una meseta que se mantiene hasta el final de la experiencia.

IV.4.2.1.2. Alteración de los sustratos metabólicos

Los resultados fueron sometidos a los estimadores estadísticos enunciados en el apartado III.2.6.2.5.

IV.4.2.1.2.1. Albúmina (ALB)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

		<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
	Control	7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	3,3(0,1)	2,7(0,2)	2,5(0,25)	2,5(0,3)	2,3(0,2)	1,8(0,3)	2,1(0,3)

Tabla 39 Evolución semanal de la albúmina (g/dl)

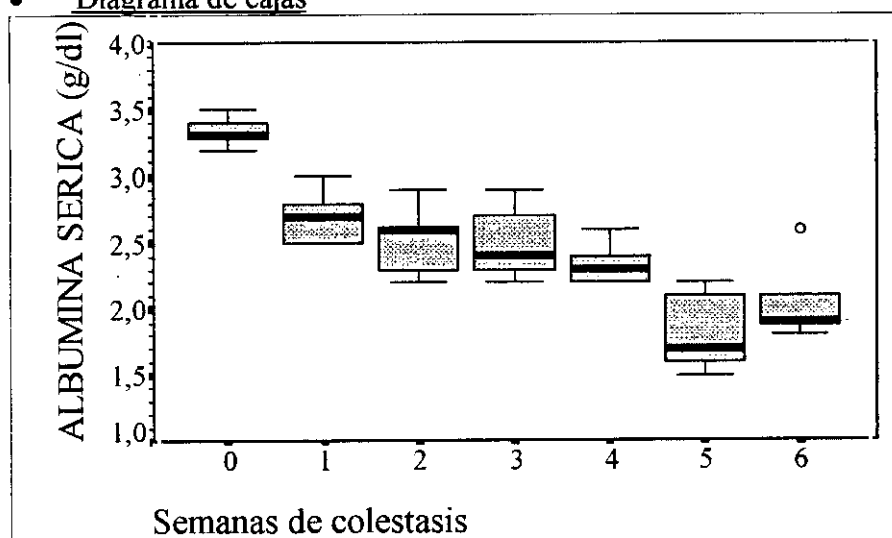
Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
31,9205	6	0,0000

- **Comparaciones múltiples:** procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	<i>SEMANAS</i>						
		5	6	4	3	2	1	0
1,82	5							
2,06	6							
2,34	4	*						
2,50	3	*						
2,52	2	*						
2,70	1	*	*					
3,32	0	*	*	*	*	*	*	

- **Diagrama de cajas**



- **Inferencia estadística**

La colestasis provoca un decremento significativo ($\chi^2=31,9205$;

$p=0,0000$) de la concentración sérica de albúmina.

Durante las 6 semanas que duró la experiencia la albuminemia se mantuvo por debajo de los valores normales correspondientes al grupo de control ($p \leq 0,05$).

De las semanas 1ª a la 4ª la concentración de este metabolito no presentó descensos significativos en su concentración sanguínea.

Sin embargo, en la 5ª semana se produjo un decremento significativo que se mantuvo durante la 6ª semana.

IV.4.2.1.2.2. Proteínas totales (PROT)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	6,3(0,3)	6(0,25)	6(0,15)	6,3(0,5)	6,7(0,1)	6,6(0,6)	6,9(0,3)

Tabla 40 Evolución semanal de las proteínas totales (g/dl)

- Análisis de la variancia (ANOVA)

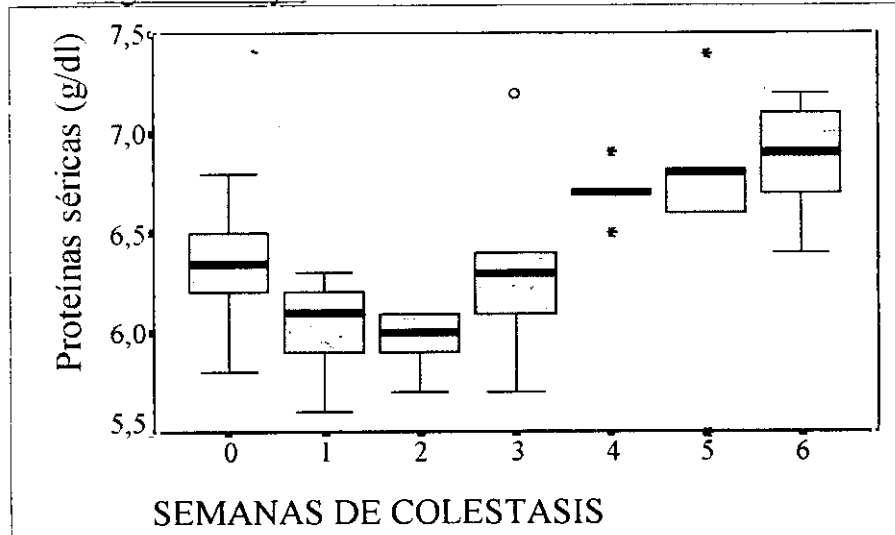
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medias cuadráticas</i>	<i>F de Snedecor</i>
Entre grupos	3,5060	6	0,5843	3,9409
Residual	4,8930	33	0,1483	$p=0,0044$
Total	8,3990	39		

- Coeficiente η^2
 $\eta^2 = 0,4174$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		<i>SEMANAS</i>							
Media arit.	Grupos	2	1	0	3	5	4	6	
5,96	2								
6,02	1								
6,33	0								
6,34	3								
6,62	5								
6,70	4								
6,86	6	*	*						

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

La concentración de proteínas sanguíneas difiere significativamente ($F=3,9409$; $p=0,0044$) dependiendo del tiempo de colestasis. Se puede considerar que el 41,7% de esta variación se debe a la interrupción quirúrgica del flujo biliar.

La única conclusión posible, a la vista del test de Bonferroni, es que en las dos últimas semanas del experimento la proteinemia experimenta un incremento significativo ($p<0,05$) respecto a los resultados obtenidos en la 1ª y 2ª semanas.

IV.4.2.1.2.3. Bilirrubina total (TBIL)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	0,1(0,0)	7(2,9)	5,9(1,4)	6,3(1,4)	6,7(1,3)	6,9(1,5)	6,7(1,1)

Tabla 41. Evolución semanal de la bilirrubina total (mg/dl)

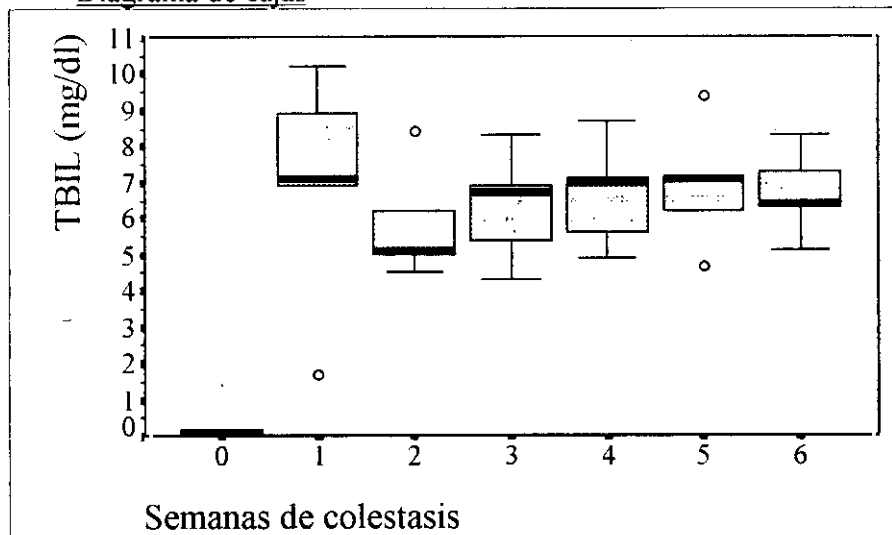
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
23,9089	6	0,0005

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		<i>SEMANAS</i>							
Media arit.	Grupos	0	2	3	4	6	5	1	
0,10	0								
5,86	2	*							
6,32	3	*							
6,66	4	*							
6,70	6	*							
6,92	5	*							
6,96	1	*							

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

Incremento significativo ($\chi^2=23,9089$; $p=0,0005$) de la concentración sérica de bilirrubina total durante la colestasis.

Al observar el gráfico correspondiente y al compararlo con el test de contrastes múltiples de Bonferroni, se observa que el incremento se produce en la primera semana, permaneciendo con una concentración sérica media de 6,6 mg/dl durante el resto del periodo experimental.

IV.4.2.1.2.4. Bilirrubina directa (DBIL)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	0,0(0,0)	5,4(2,2)	4,9(0,8)	3,7(1,5)	4,6(1,1)	3,6(0,75)	4,6(0,8)

Tabla 42 Evolución semanal de la bilirrubina directa (mg/dl)

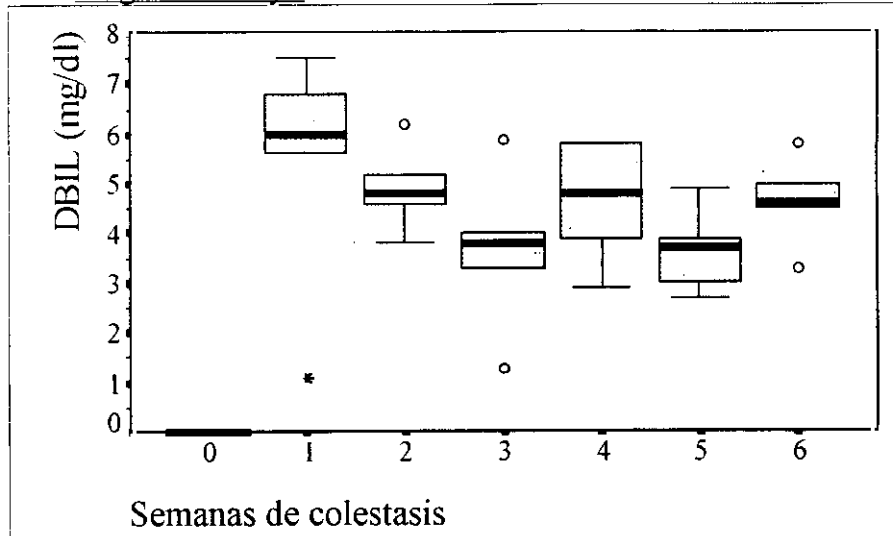
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
26,1656	6	0,0002

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		<i>SEMANAS</i>							
Media arit.	Grupos	0	5	3	4	6	2	1	
0,00	0								
3,64	5	*							
3,66	3	*							
4,64	4	*							
4,64	6	*							
4,92	2	*							
5,40	1	*							

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

Aumento significativo ($\chi^2=26,1656$; $p=0,0002$) de la bilirrubina no conjugada (directa) como consecuencia de la interrupción crónica del flujo biliar.

El incremento se pone de manifiesto en la primera semana de colestasis permaneciendo en este estado hasta el final de la experiencia, con una concentración media de 4,5(1,5) mg/dl.

IV.4.2.1.2.5. Creatinina (CREA)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	0,5(0,1)	0,7(0,2)	0,9(0,5)	0,4(0,04)	0,5(0,1)	0,6(0,1)	0,8(0,1)

Tabla 43 . Evolución semanal de la creatinina (mg/dl)

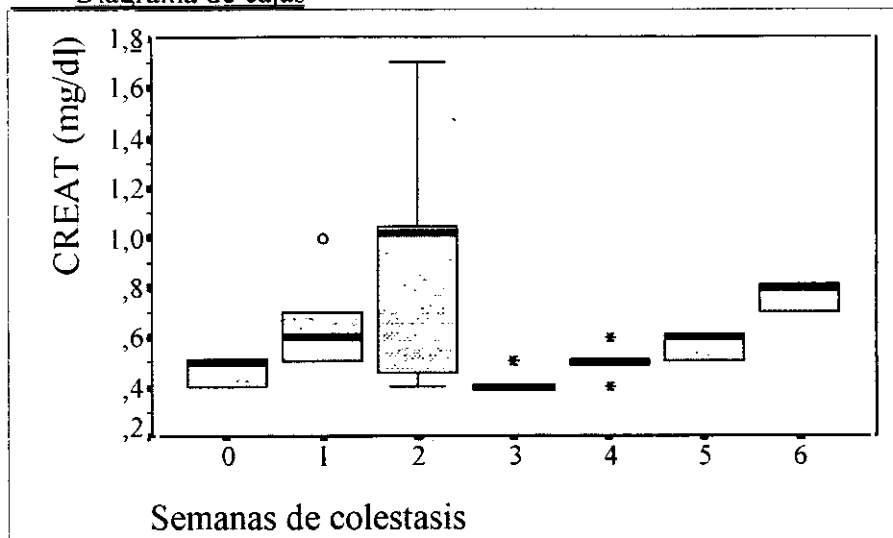
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
20,3425	6	0,0024

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		<i>SEMANAS</i>							
Media arit.	Grupos	3	0	4	5	1	6	2	
0,42	3								
0,47	0								
0,50	4								
0,56	5								
0,66	1								
0,76	6								
0,93	2	*	*	*					

- **Diagrama de cajas**



- **Inferencia estadística**

Las medias de creatinina sérica de los individuos con diferentes tiempos de colestasis difieren significativamente ($\chi^2=20,3425$; $p=0,0024$).

Los responsables de la elevación de la concentración sérica de esta constante sanguínea son los individuos integrantes del grupo de 2 semanas de colestasis. En el restante periodo experimental la creatinemia permaneció con valores normales.

Para comprobar si el incremento en la concentración de creatinina sérica habido en la 2ª semana era o no significativo respecto de su valor inicial se procedió a utilizar un método estadístico de comparación de medias. Este extremo se verificó mediante un test no paramétrico –U Mann Whitney–, dado que los datos recogidos en esta 2ª semana infringían el supuesto de normalidad, con lo que se demostró la ausencia de diferencias significativas entre ambas series de datos ($z=-1,2388$; $p=0,2154$).

IV.4.2.1.2.6. Urea (UREA)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	Días de colestasis extrahepática					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	47,1(4,2)	27,7(3,7)	34,6(3,3)	34,4(1,4)	45,3(7)	58,8(20,6)	35,5(2,3)

Tabla 44. *Evolución semanal de la urea (mg/dl)*

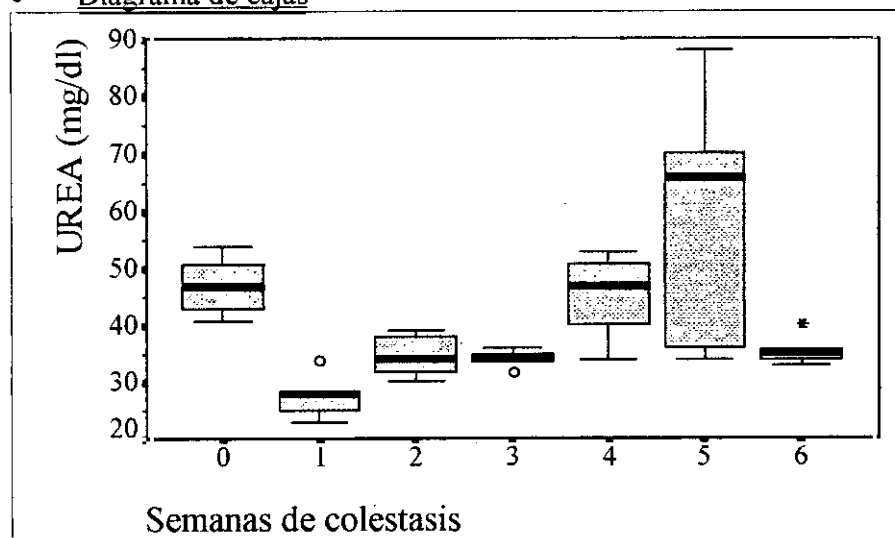
- **Test de Kruskal-Wallis**

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
26,0297	6	0,0002

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Diferencia significativa)								
		SEMANAS						
Media arit.	Grupos	1	3	2	6	4	0	5
27,6	1							
34,2	3							
34,6	2							
35,4	6							
45,0	4							
47,1	0	*						
58,8	5	*	*	*	*			

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

La colestasis modifica la concentración de urea en sangre ($\chi^2=26,0297$; $p=0,0002$).

La uremia mostró el siguiente comportamiento:

- Decremento significativo en la 1ª semana de colestasis.
- Recuperación durante las 3 semanas siguientes de valores comparables con los del grupo de control.
- En la 5ª semana se incrementa la uremia respecto a semanas anteriores para remitir en la última semana de observación.

IV.4.2.1.2.7. Glucosa (GLU)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	Días de colestasis extrahepática					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	170(8)	148(18)	127(6,5)	109(12)	130(9)	126(8)	113(17)

Tabla 45 Evolución semanal de la glucosa (mg/dl)

• <u>Análisis de la variancia (ANOVA)</u>				
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medias cuadráticas</i>	<i>F de Snedecor</i>
Entre grupos	19383,8000	6	3230,6333	20,6302
Residual	5167,7000	33	156,5970	p=0,0000
Total	24551,5000	39		

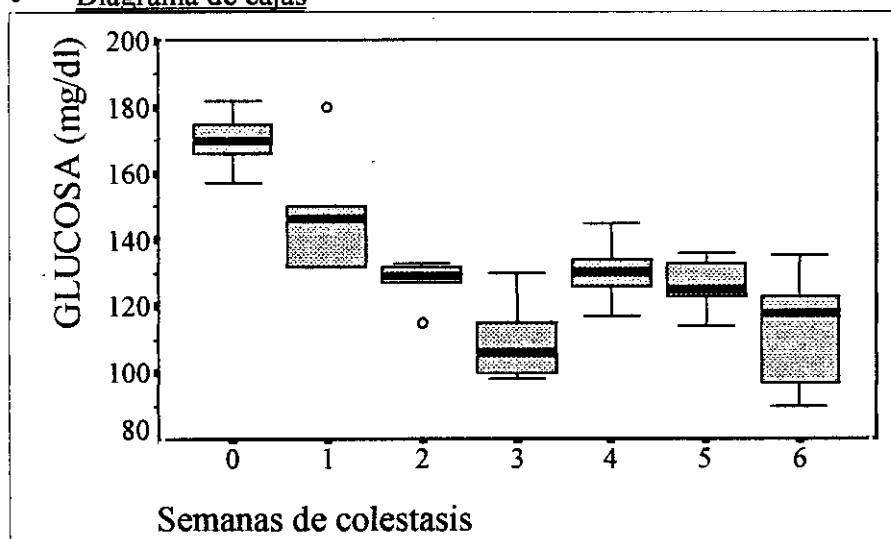
- Coefficiente η^2

$$\eta^2 = 0,7895$$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	SEMANAS							
	Grupos	3	6	5	2	4	1	0
109,8	3							
112,6	6							
126,2	5							
127,2	2							
130,4	4							
148,0	1	*	*					
169,9	0	*	*	*	*	*		

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

La glucemia desciende tras la colestasis ($F=20,6302$; $p=0,0000$). El estasis biliar es responsable del 79% de este decremento.

La bajada de la concentración de glucosa sanguínea se produce en dos etapas:

- Descenso de glucemia en la 1ª semana de colestasis, manteniendo esta concentración en la siguiente.
- Nueva caída en la 3ª semana que permanece en niveles semejantes hasta el final.

IV.4.2.1.2.8. Colesterol (CHOL)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

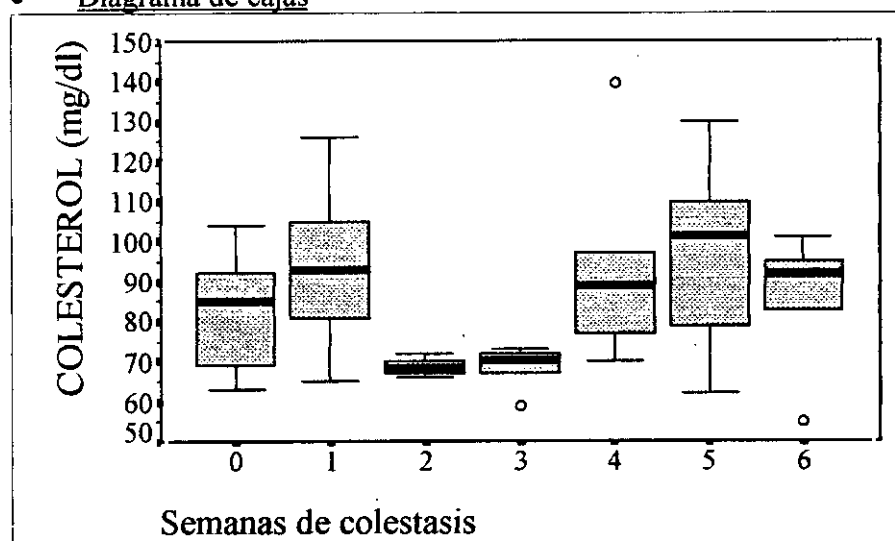
	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	83(13)	94(21)	69(2)	68(5)	94(25)	96(24)	85(16)

Tabla 46 *Evolución semanal del colesterol (mg/dl)*• Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
10,5231	6	0,1043

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa).

No existe ningún grupo con diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

• Diagrama de cajas• Inferencia estadística

La colestasis no afecta de forma estadísticamente significativa sobre la concentración sérica de colesterol ($\chi^2=10,5231$; $p=0,1043$).

El test de Bonferroni no detecta ningún grupo que difiera de otro significativamente, en todas las comparaciones $p > 0,05$.

IV.4.2.1.2.9. Triglicéridos (TRIG)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	129(8)	124(23)	80(13)	92(21)	102(22)	151(92)	149(60)

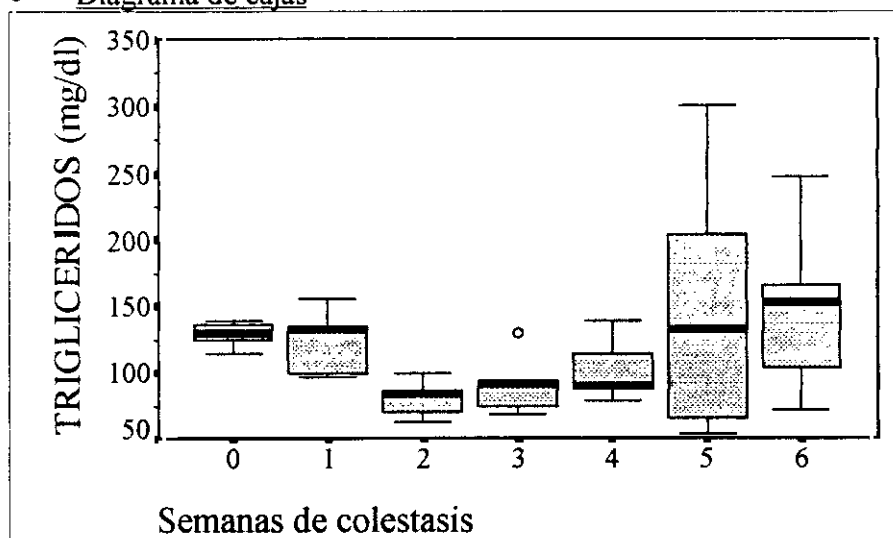
Tabla 47 *Evolución semanal de los triglicéridos (mg/dl)*• Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
12,7162	6	0,0478

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

No existe ningún grupo con diferencia significativa ($p \leq 0,05$)

- **Diagrama de cajas**



- **Inferencia estadística**

La interrupción del flujo biliar altera la concentración de triglicéridos en sangre ($\chi^2=12,7162$; $p=0,0478$).

Mediante el procedimiento de Bonferroni no se encuentra ningún grupo cuyas medias difieran significativamente de las de otros.

IV.4.2.1.2.10. Ácido úrico (UA)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	0,8(0,3)	1,3(0,3)	1,1(0,2)	0,9(0,1)	0,5(0,1)	1,2(0,4)	0,9(0,2)

Tabla 48 . Evolución semanal del ácido úrico (mg/dl)

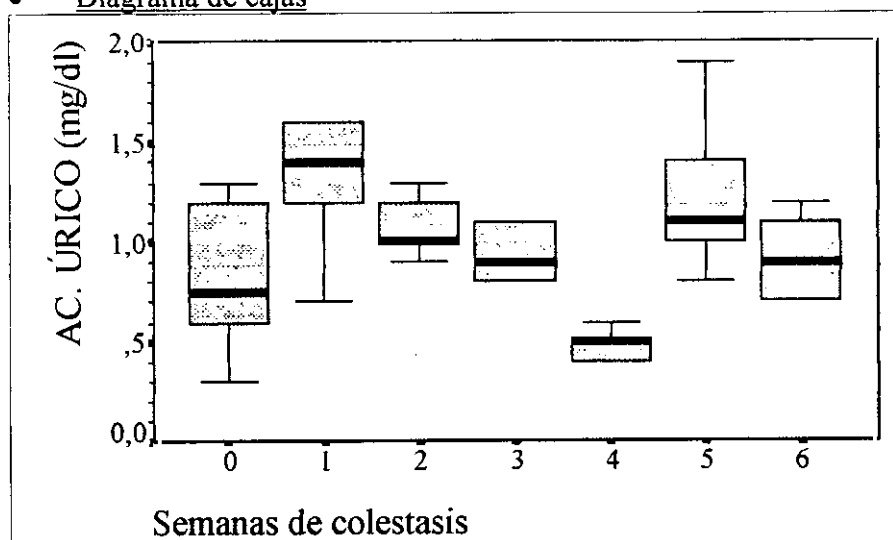
- **Test de Kruskal-Wallis**

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
17,8160	6	0,0067

- **Comparaciones múltiples:** procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		<i>SEMANAS</i>							
Media arit.	Grupos	4	0	6	3	2	5	1	
0,48	4								
0,82	0								
0,92	6								
0,94	3								
1,08	2								
1,24	5	*							
1,30	1	*							

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

Existe una relación significativa entre tiempo de colestasis y concentración de ácido úrico en sangre ($\chi^2=17,8160$; $p=0,0067$).

El test de Bonferroni pone de manifiesto que el descenso que se produce en la 4ª semana es estadísticamente significativo al ser comparado con los incrementos de la 1ª y 5ª semanas.

IV.4.2.1.3. Constantes iónicas

IV.4.2.1.3.1. Calcio (Ca^{++})

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	10(0,3)	11(0,6)	10(0,2)	10(0,5)	11(1,5)	9,6(0,3)	10(0,3)

Tabla 49 Evolución semanal del calcio (mg/dl)

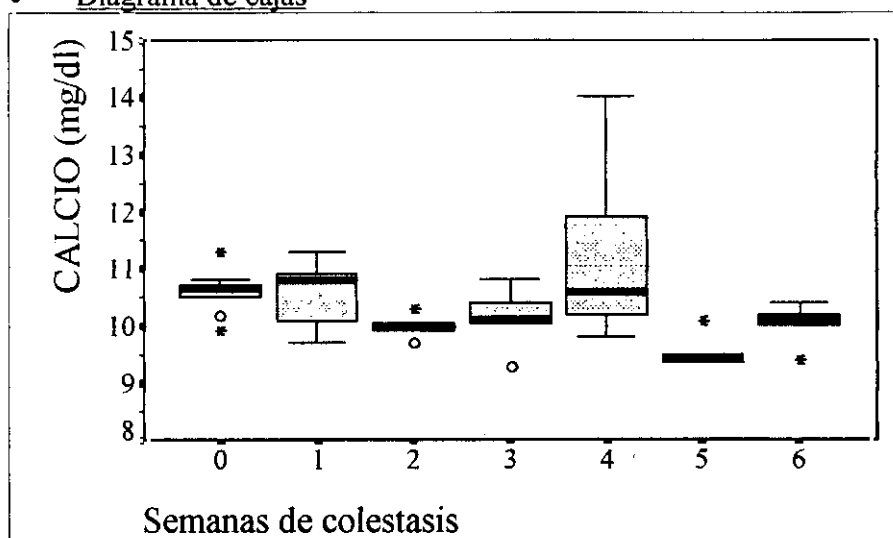
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
16,7322	6	0,0103

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	<i>SEMANAS</i>							
		5	2	6	3	1	0	4	
9,56	5								
9,98	2								
10,02	6								
10,14	3								
10,56	1								
10,59	0								
11,30	4	*							

- Diagrama de cajas



- Infereencia estadística

La colestasis provoca diferencias significativas ($\chi^2=16,7322$; $p=0,0103$) en la concentración de calcio sérico.

De la observación del diagrama de caja correspondiente, así como del resultado obtenido del contraste múltiple de Bonferroni, se puede deducir que, el único grupo responsable de esta variación (incremento) de la calcemia es el integrante de la 4ª semana.

IV.4.2.1.3.2. Hierro (Fe^{n+})

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	145(19)	68(17)	179(82)	170(45)	159(45)	220(50)	137(39)

Tabla 50. Evolución semanal del hierro (ng/l)

- Análisis de la variancia (ANOVA)

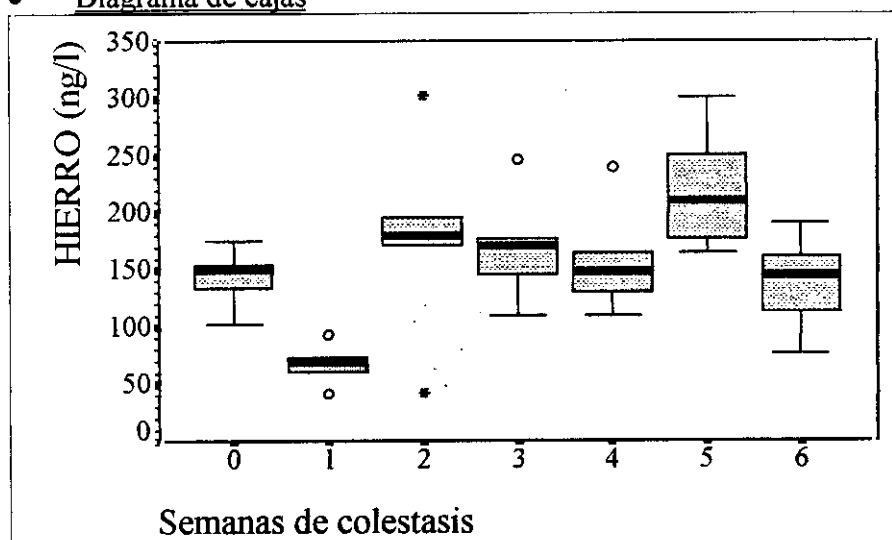
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medias cuadráticas</i>	<i>F de Snedecor</i>
Entre grupos	65618,2750	6	10936,3792	4,4527
Residual	81051,7000	33	2456,1121	p=0,0021
Total	146669,9750	39		

- Coefficiente η^2
 $\eta^2 = 0,4474$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		SEMANAS							
Media arit.	Grupos	1	6	0	4	3	2	5	
68,2	1								
137,4	6								
143,5	0								
158,8	4								
170,0	3								
178,4	2	*							
220,4	5	*							

- Diagrama de cajas



- Inferecia estadística

Existe una relación estadísticamente significativa ($F=4,4527$; $p=0,0021$) entre el tiempo de colestasis y el hierro sérico. La influencia de esta situación de estasis corresponde a un 44,7% de la variación experimentada en la concentración del ion.

Al estudiar la figura correspondiente y cotejarla con el resultado del test de Bonferroni se aprecia como es la ferropenia detectada en la primera semana de colestasis es la responsable de dicha variación global.

Para comprobar si este decremento es o no consecuencia de la intervención quirúrgica se sometieron a un t-test la serie de operación simulada y la serie control. No hubo diferencia significativa entre ambas series ($t=0,16$; $p=0,874$).

Al realizar el mismo test entre la serie de operación simulada y los resultados de 1 semana de colestasis, se puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($t=6,01$; $p=0,000$).

IV.4.2.1.3.3. Sodio (Na^+)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

		Días de colestasis extrahepática					
	Control	7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	140(2)	143(1,7)	137(2)	137(2,4)	139(1,7)	135(2,6)	135(1)

Tabla 51 Evolución semanal del sodio (mEq/l)

• Análisis de la variancia (ANOVA)				
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias cuadráticas	F de Snedecor
Entre grupos	982,2750	6	163,7125	21,4641
Residual	251,7000	33	7,6273	p=0,0000
Total	1233,9750	39		

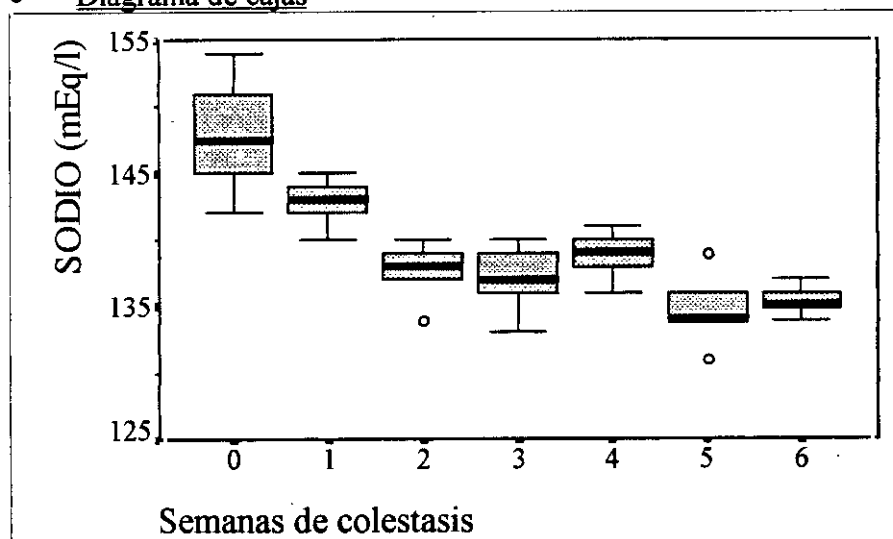
• Coefficiente η^2

$$\eta^2 = 0,7960$$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	SEMANAS							
	Grupos	5	6	3	2	4	1	0
134,8	5							
135,4	6							
137,0	3							
137,6	2							
138,8	4							
142,8	1	*	*	*				
147,9	0	*	*	*	*	*	*	

• Diagrama de cajas



• Inferencia estadística

La natremia se ve afectada de forma significativa ($F=21,4641$; $p=0,0000$) en individuos sometidos a la ligadura y sección del colédoco. Esta práctica quirúrgica provoca el 79,6% de la alteración.

El decremento se inicia en la primera semana postcolestasis, manteniéndose en la siguiente. En la 3ª semana se produce un nuevo descenso, que se estabiliza durante el resto de la experiencia.

IV.4.2.1.3.4. Potasio (K^+)

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	4(0,2)	5,2(0,3)	5,1(0,6)	4,2(0,2)	4,7(0,4)	5,1(0,7)	5(0,2)

Tabla 52 Evolución semanal del potasio (mEq/l)

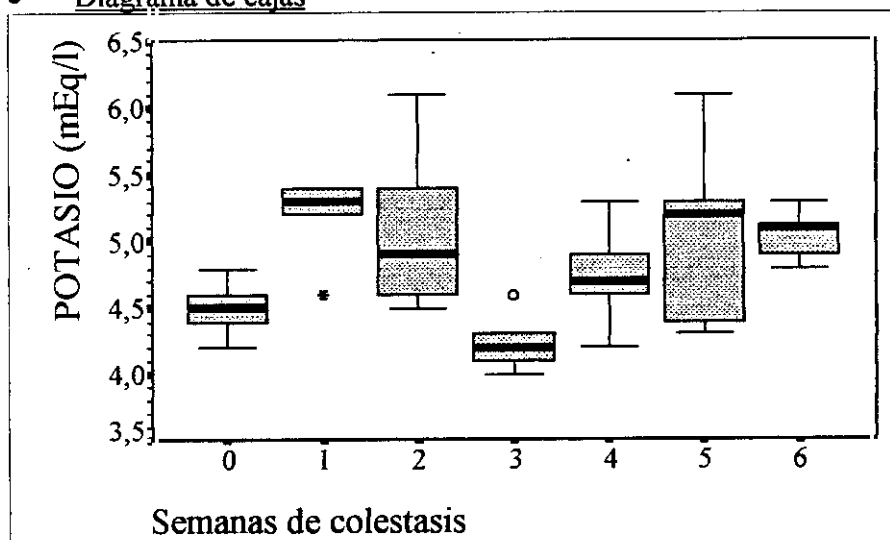
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
19,2469	6	0,0038

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

	<i>SEMANAS</i>							
Media arit.	Grupos	3	0	4	6	5	2	1
4,24	3							
4,48	0							
4,74	4							
5,04	6							
5,06	5							
5,10	2							
5,18	1	*						

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

Presencia de alteraciones significativas ($\chi^2=19,2469$; $p=0,0038$) de la kalemia tras la colestasis.

El incremento de la concentración de potasio de la 1ª semana y el descenso de la misma en la 3ª, son los grupos responsables de dichas alteraciones.

IV.4.2.1.4. Proteinograma

En el presente apartado se muestran los resultados obtenidos de la banda electroforética que corresponde a la albúmina, y de las distintas fracciones globulínicas.

IV.4.2.1.4.1. Albúmina sérica

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	Días de colestasis extrahepática					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	52(2,3)	43(1,8)	42(2,6)	38(2,4)	35(2,9)	29(1,3)	30(1,2)

Tabla 53. Evolución semanal de la albúmina sérica detectada mediante electroforesis (%)

• Análisis de la variancia (ANOVA)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias cuadráticas	F de Snedecor
Entre grupos	2899,6688	6	483,2781	101,4870
Residual	157,1450	33	4,7620	p=0,0000
Total	3056,8138	39		

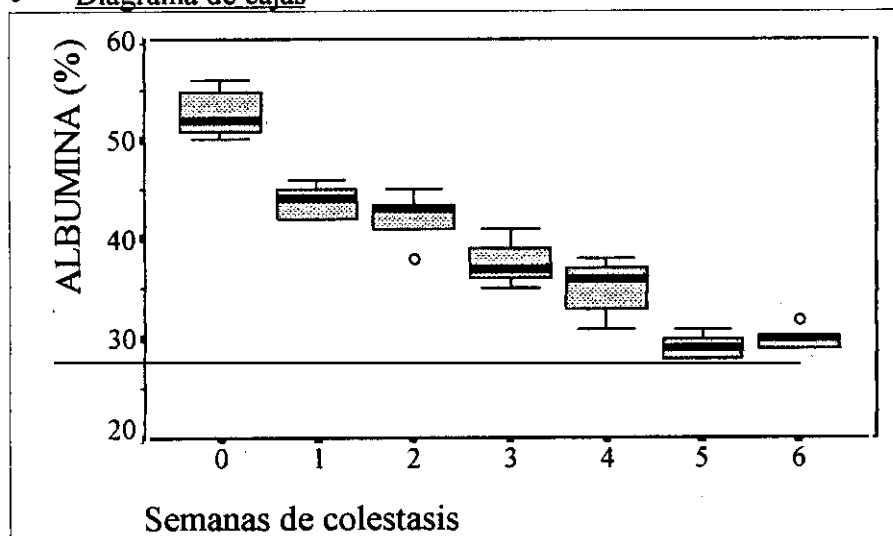
• Coefficiente η^2

$$\eta^2 = 0,9486$$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

	SEMANAS							
Media arit.	Grupos	5	6	4	3	2	1	0
29,20	5							
30,00	6							
35,00	4	*	*					
37,60	3	*	*					
42,00	2	*	*	*				
43,80	1	*	*	*	*			
52,55	0	*	*	*	*	*	*	

• Diagrama de cajas



• Inferencia estadística

La concentración de albúmina sérica disminuye significativamente ($F=101,4870$; $p=0,0000$) en función del tiempo de colestasis. El 95% de este decremento se explica por el tiempo de estasis biliar.

Desde la primera semana se produce un descenso de la proporción de albúmina que se va acentuando a lo largo del periodo experimental, para estabilizarse en las dos

últimas semanas.

IV.4.2.1.4.2. α_1 - globulinas

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

		<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
	Control	7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	7,4(0,9)	5(0,7)	3,4(0,5)	2,9(0,6)	2(0,3)	5(0,4)	4,9(0,7)

Tabla 54. Evolución semanal de las α_1 - globulinas (%)

• Análisis de la variancia (ANOVA)

<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medias cuadráticas</i>	<i>F de Snedecor</i>
Entre grupos	132,6588	6	22,1098	51,4508
Residual	14,1810	33	0,4297	p=0,0000
Total	146,8398	39		

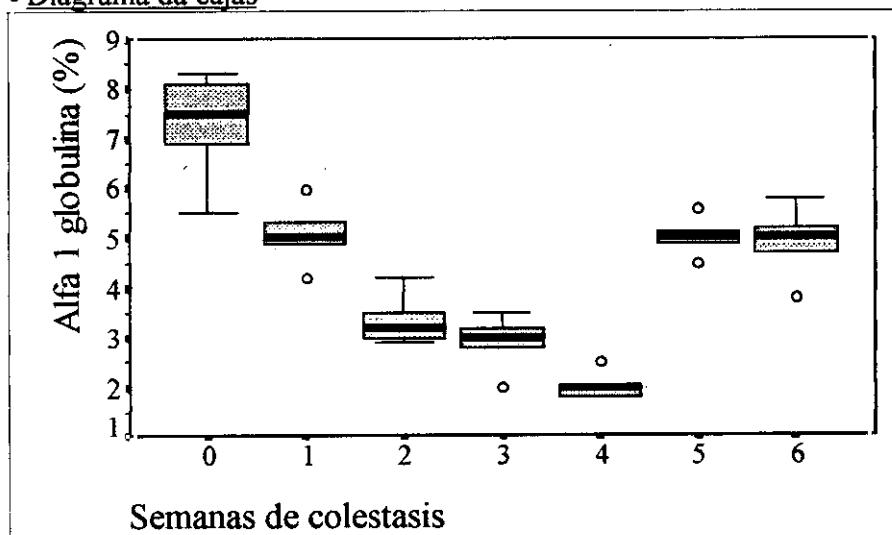
• Coefficiente η^2

$$\eta^2 = 0,9034$$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		<i>SEMANAS</i>						
Media arit.	Grupos	4	3	2	6	5	1	0
2,02	4							
2,90	3							
3,36	2							
4,90	6	*	*	*				
5,02	5	*	*	*				
5,08	1	*	*	*				
7,35	0	*	*	*	*	*	*	

• Diagrama de cajas



• **Inferecia estadística**

La colestasis afecta de forma significativa ($F=51,4508$; $p=0,0000$) a la proporción sérica de α_1 globulinas. La participación de este proceso nosológico se cifra en un 90,3%.

A lo largo de las 6 semanas que duró la experiencia, el porcentaje de esta globulina permaneció por debajo de los límites basales. La cronología de este decremento sería la siguiente:

- descenso significativo en la primera semana respecto al control,
- se intensifica dicha trayectoria en semanas consecutivas,
- recuperación durante las dos últimas semanas del porcentaje correspondiente a la 1ª.

IV.4.2.1.4.3. α_2 - globulinas

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	6,8(0,6)	11(1,4)	6(1,9)	9(1)	10(1,3)	14(3)	13(1,8)

Tabla 55. Evolución semanal de las α_2 - globulinas (%)

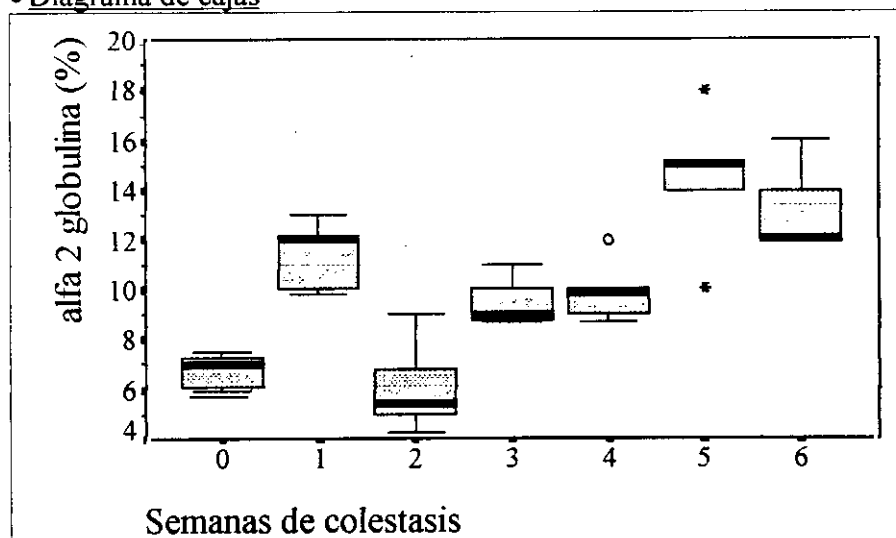
• **Test de Kruskal-Wallis**

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
32,6144	6	0,0000

- **Comparaciones múltiples:** procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	<i>SEMANAS</i>							
		2	0	3	4	1	6	5	
6,1	2								
6,8	0								
9,5	3	*							
9,9	4	*	*						
11,4	1	*	*						
13,2	6	*	*	*	*				
14,4	5	*	*	*	*				

• Diagrama de cajas



• Inferencia estadística

La colestasis altera significativamente ($\chi^2=32,6144$; $p=0,0000$) el tanto por ciento de α_2 globulina en sangre.

Al comparar los distintos grupos entre sí mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni se pone de manifiesto:

- en la primera semana de colestasis se incrementa la proporción de esta globulina,
- en la siguiente semana recupera valores normales,
- en las semanas 3ª y 4ª se alcanzan valores semejantes a los obtenidos en la 1ª semana,
- en las 2 semanas restantes de la experiencia se consiguen valores máximos.

IV.4.2.1.4.4. β - globulinas

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	22(2,3)	28(2,8)	31(2,3)	31(2,3)	33(1,9)	32(3,2)	32(1,8)

Tabla 56. Evolución semanal de las β - globulinas (%)

• Análisis de la variancia (ANOVA)

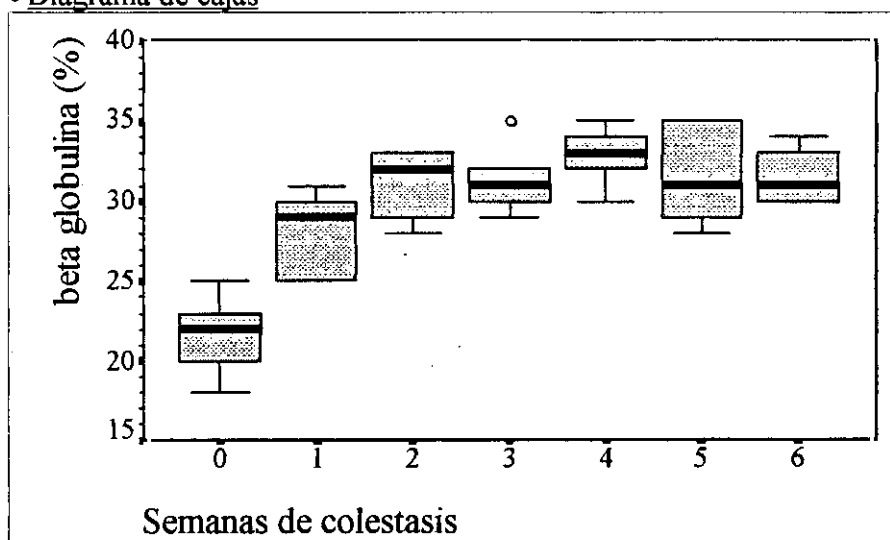
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Medias cuadráticas</i>	<i>F de Snedecor</i>
Entre grupos	723,4750	6	120,5792	20,6707
Residual	192,5000	33	5,8333	$p=0,0000$
Total	915,9750	39		

• Coeficiente η^2
 $\eta^2=0,7898$

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	SEMANAS						
		0	1	2	3	5	6	4
21,7	0							
28,0	1	*						
31,0	2	*						
31,4	3	*						
31,6	5	*						
31,6	6	*						
32,8	4	*						

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

La colestasis incrementa de forma significativa ($F=20,6707$; $p=0,0000$) la concentración de β globulina. El 79% de este aumento se debe al tiempo de colestasis.

El porcentaje máximo de esta globulina se obtiene en la primera semana de colestasis y se mantiene hasta el final de la experiencia.

IV.4.2.1.4.5. γ - globulinas

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	Días de colestasis extrahepática					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	12(1,8)	10(0,6)	16(1,6)	17(1,8)	19(1,3)	19(0,8)	20(1,3)

Tabla 57. Evolución semanal de las γ - globulinas (%)

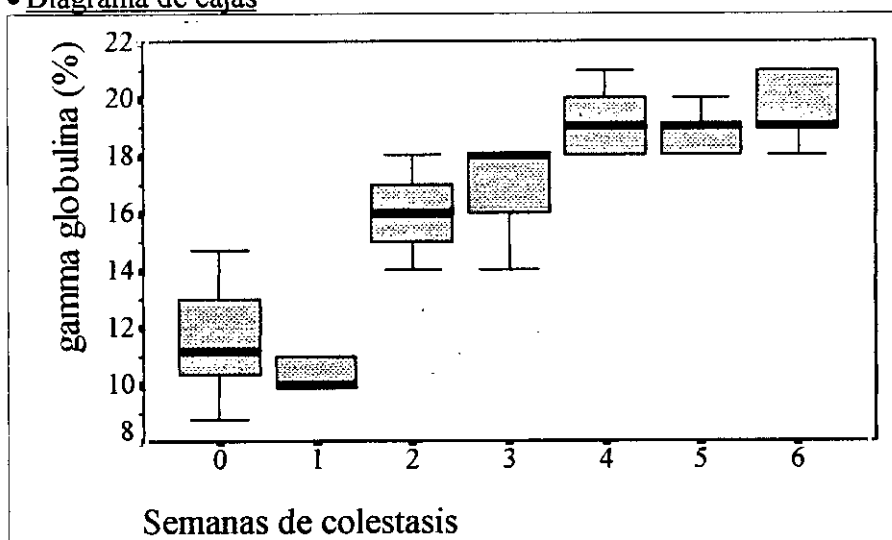
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
33,2959	6	0,0000

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

		SEMANAS						
Media arit.	Grupos	1	0	2	3	5	4	6
10,36	1							
11,58	0							
16,00	2	*	*					
16,80	3	*	*					
18,80	5	*	*					
19,20	4	*	*	*				
19,60	6	*	*	*				

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

El tiempo de colestasis lleva aparejado un incremento significativo del porcentaje de γ globulina sérica ($\chi^2=33,2959$; $p=0,0000$).

Es a partir de la 2ª semana cuando empieza a incrementarse esta globulina. Este aumento alcanza una meseta en la 4ª semana que se mantiene hasta la última observación.

IV.4.2.2. Alteraciones hematológicas

IV.4.2.2.1. Actividad de protrombina

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

	Control	Días de colestasis extrahepática					
		7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	96(5)	56(4)	81(1)	84(7)	80(6)	80(4)	76(3)

Tabla 58. Evolución semanal del tiempo de protrombina (%)

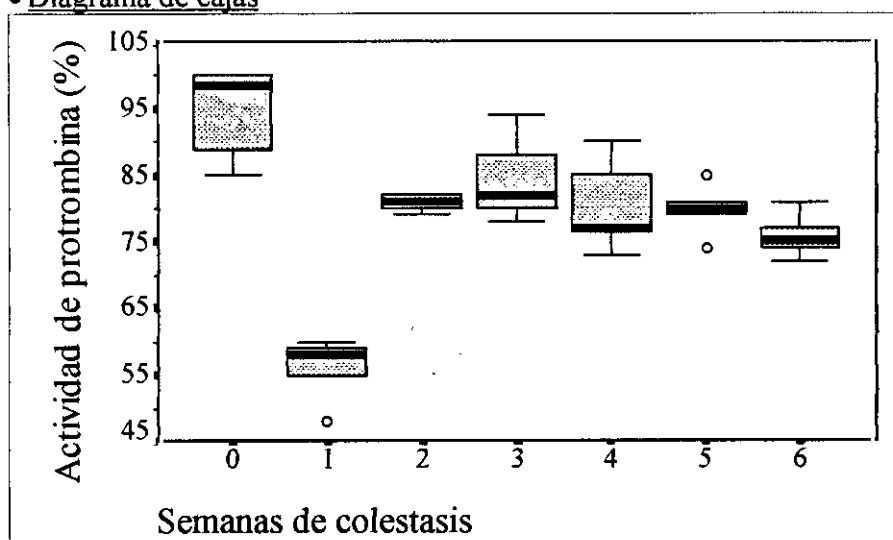
- Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
29,8231	6	0,0000

- Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	SEMANAS						
		1	6	5	4	2	3	0
56,0	1							
75,8	6	*						
79,8	5	*						
80,4	4	*						
80,8	2	*						
84,4	3	*						
95,5	0	*	*	*	*	*	*	

- Diagrama de cajas



- Inferencia estadística

La actividad de la protrombina desciende significativamente ($\chi^2=29,8231$; $p=0,0000$) durante la colestasis.

En la 1ª semana se detecta un mínimo que es significativo respecto al resto de semanas. Para comprobar si este mínimo era o no debido a la intervención quirúrgica sin colestasis o con colestasis se realizaron los siguientes:

- U de Mann Whitney: serie de control contra la de operación simulada. El resultado fue que no existen diferencias significativas ($z=-1,413$; $p=0,1575$),
- t Test: serie de operación simulada contra 1 semana de colestasis. El resultado puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($t=9,58$; $p=0,000$).

Al valorar la actividad de protrombina, en la 2ª semana, se aprecia una recuperación del mínimo, pero se siguen manteniendo porcentajes inferiores a los del control durante el resto de experiencia.

IV.4.2.2.2. Valor hematocrito

Como medida de tendencia central se presenta la media aritmética (\bar{x}); y como medida de dispersión, la desviación estándar (DE).

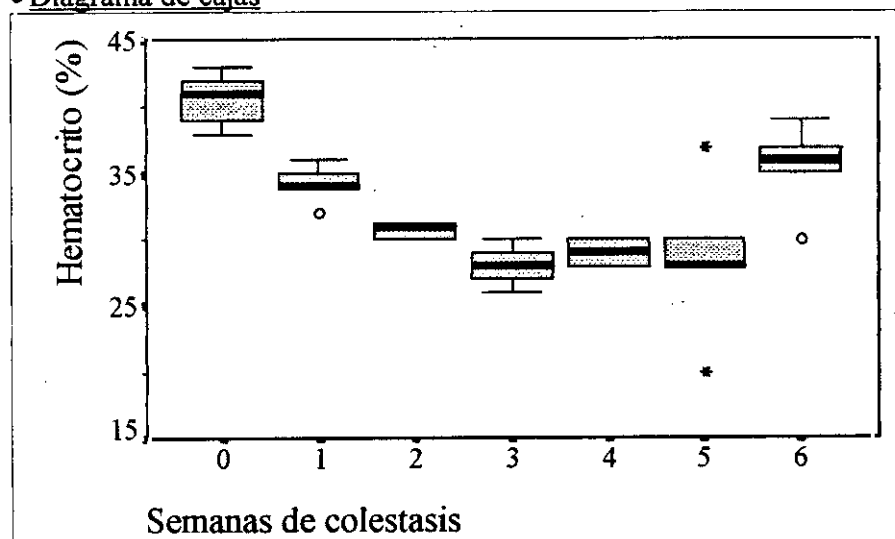
		<i>Días de colestasis extrahepática</i>					
	Control	7	14	21	28	35	42
\bar{x} (DE)	41(2)	34(1)	31(0,5)	28(1)	29(1)	29(6)	35(3)

Tabla 59. *Evolución semanal del valor hematocrito (%)*• Test de Kruskal-Wallis

χ^2	Grados de libertad	Grado de significación
31,9493	6	0,0000

• Comparaciones múltiples: procedimiento de Bonferroni (método de la mínima diferencia significativa)

Media arit.	Grupos	<i>SEMANAS</i>							
		3	5	4	2	1	6	0	
28,0	3								
28,6	5								
29,0	4								
30,6	2								
34,2	1	*							
35,4	6	*	*	*					
40,7	0	*	*	*	*	*	*	*	

• Diagrama de cajas• Inferencia estadística

Existe una relación estadísticamente significativa ($F=31,9493$; $p=0,0000$) entre la colestasis y el valor hematocrito.

El hematocrito permaneció por debajo de los límites normales durante todo el tiempo de colestasis. El decremento se hizo mínimo en la 3ª semana de colestasis, valor que mantuvo durante las 2 siguientes. La última semana se produjo un incremento, adquiriendo un valor semejante al obtenido al transcurrir 1 semana de colestasis.

V. DISCUSIÓN

V.1. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA

En la bibliografía consultada no se han encontrado estudios reglados de supervivencia, en los que se haya utilizado procedimientos estadísticos adecuados – métodos de Kaplan Meier o actuarial –, para determinar los valores que esta variable presente en este o en otros modelos experimentales de cirrosis. En la mayoría apenas se hace mención al mayor o menor porcentaje de mortalidad del método en estadios iniciales (Proctor E *et al*, 1982²⁷; Tamayo RP, 1983⁷⁷; y en otros apenas se destaca suficientemente la alta mortalidad que se provoca (Rubin *et al*, 1967³⁴; Castro e Silva O *et al*, 1995⁷⁸).

Al examinar los resultados del estudio de supervivencia obtenidos del presente trabajo destacó de inmediato que, la supervivencia en ratas sometidas a la obstrucción crónica del colédoco no sigue una distribución normal sino exponencial.

A los 10 días de colestasis, solo sobreviven 50 de 100 animales que fueron sometidos a ligadura y sección del colédoco. Se trata de un periodo crítico, ya que se produce la máxima cantidad de muertes por unidad de tiempo. Castro e Silva O *et al*, en 1995⁷⁸, con una ligadura simple del colédoco, obtuvieron una tasa del 17% de mortalidad en los primeros 10 días de colestasis, muy inferior a lo hallado en el presente estudio.

Es una fase también decisiva en otros modelos experimentales que persiguen el mismo fin. Tal es el caso de los que emplean el CCl₄ como método inductor de cirrosis experimental, en los que se observa que, a los 7 días de tratamiento, se produce entre un 30% y un 60% de mortalidad (Proctor E *et al*, en 1982²⁷; Tamayo RP, en 1983⁷⁷).

En el intervalo comprendido entre 10 y 60 días, la supervivencia decrece, pero ralentizada respecto a la fase precedente. Zimmermann H *et al*, en 1994⁷⁹, observaron a los 30 días de la ligadura y sección del colédoco una tasa de supervivencia del 76%; y Marinelli A *et al*⁸⁰, un año más tarde, la establecieron en el 63,75%. La tasa conseguida en el presente estudio, para el mismo periodo de tiempo, fue del 27,84%, muy por debajo de la de los citados autores. Hay que destacar que ellos basaron su estudio de supervivencia sobre una muestra de 8 y 51 individuos, respectivamente, frente a los 100 de este trabajo.

En los días sucesivos, hasta el final de la experiencia, la supervivencia se estabiliza, con una proporción de supervivencia acumulada comprendida entre 0,10 y 0,15 en tanto por 1.

Los datos procedentes del actual estudio de supervivencia muestran una marcada asimetría hacia la izquierda. Se puede comprobar por la posición de la mediana –como índice descriptivo de la tendencia central– dentro del IQR –como índice de dispersión–, que corresponde al intervalo existente entre los días 6 y 35 después de la ligadura y sección del colédoco, y que se muestra en el diagrama de caja correspondiente.

Se aprecia la existencia de 13 valores extremos de supervivencia, de un total de 100, en los que se supera el tiempo de observación concedido al experimento –152 días–.

Al iniciar el estudio de supervivencia, se partía de la hipótesis de que la ligadura y sección del colédoco provoca, directa o indirectamente, la muerte de los animales sujetos al experimento. Que un 13% de los casos haya sobrevivido indica que, en ellos, se habría reiniciado el flujo biliar.

El restablecimiento de la coleresis fue detectado por primera vez por Brodie B,

en 1823⁴¹, al practicar la ligadura simple del colédoco en gatos. La adquisición de nuevo del flujo biliar se consiguió entre los 7 y 8 días postligadura. Otros autores describieron el mismo hallazgo en diferentes animales: Legg JW, en 1873⁴³, en gatos; Charcot LM *et al*, en 1876⁴⁴, en cobayas; y Foa P *et al*, en 1877⁴⁵, en perros.

Cameron GR *et al*, en 1932⁴⁶, y posteriormente Weinbren K, en 1953⁸¹, sugirieron una primera explicación: la recanalización del conducto previamente sometido a obstrucción mediante doble ligadura.

Años más tarde Trams EG *et al*, en 1957⁴², comprobaron que, si se efectuaba una única ligadura del colédoco se producía, a los 14 días, el 98% de recanalizaciones. Sin embargo, si se realizaba la sección del colédoco no se producía el restablecimiento del flujo biliar.

Kraus GE *et al*, en 1959⁵⁴, plantearon la hipótesis de que tras la dilatación del colédoco proximal, se produciría el prolapso de las paredes del saco sobre la ligadura; posteriormente su adherencia; y, finalmente, la necrosis de las paredes unidas, restableciéndose, en consecuencia, el flujo biliar.

Trams EG *et al*, en 1957⁴², además de la doble ligadura, seccionaron el conducto y comprobaron que, con ello, no se producía el restablecimiento del flujo biliar.

A similares conclusiones llegaron Cameron GR *et al*, en 1960⁸², con la salvedad de que el restablecimiento del flujo biliar se producía al transcurrir, al menos, 28 días después de la ligadura simple del colédoco. Y afirmaron que el factor responsable de la recanalización del conducto era la propia ligadura, al fusionarse el epitelio glandular hiperplásico de ambos lados de la misma.

En 1961, Steiner PE *et al*⁸³ observaron que había ratas que sobrevivían, durante varias semanas, a la doble ligadura del colédoco. Mencionaban como al transcurrir 1 semana de este hecho, se producía dilatación en su posición proximal; posteriormente observaron disminución de su tamaño, quizá por rotura de alguna ligadura. A las 8 semanas de colestasis, el colédoco proximal era dos veces el tamaño normal. No vieron colaterales.

Sin embargo, sí las vieron Wright JE *et al*, en 1964⁵⁶, quienes efectuaron la ligadura del colédoco, sin seccionarlo. Detectaron la existencia de colaterales que puenteaban la zona ligada, restableciendo la coleresis a los 28 días.

repermeabilización

Los trabajos que presentan, como un hecho cierto, el restablecimiento del flujo biliar, no demuestran las circunstancias en que éste se produce. Únicamente afirman que se debe a la recanalización del colédoco.

Owen J *et al*, en 1975⁸⁴ y Kountouras J *et al*, en 1984⁵³, tras la ligadura y sección del conducto biliar común de la rata, no encontraron ningún conducto biliar que restableciera dicho flujo. Años más tarde, en 1990, otros autores como Tsukamoto H *et al*⁸⁵, observaron la posibilidad de esta recanalización, por uno u otro sistema, y la consiguiente reversibilidad de los cambios estructurales originados hasta la misma.

Los estudios colangiográficos del presente trabajo, evidencian en 9 de los 13 casos (70%) de animales supervivientes a los 152 días de colestasis, un fino conducto que, partiendo del colédoco distal, restablecería el flujo biliar al abocar al duodeno. Hay que destacar que los presentes experimentos se han realizado aplicando doble ligadura y posterior sección del colédoco. Con ello se elimina toda posibilidad de recanalización del colédoco ya que se encuentran ambos extremos físicamente distantes.

No se pudo determinar la existencia histológica de este fino conducto. A tenor de lo observado por Wright JE *et al*⁵⁵, podría estar revestido por células cuboidales semejantes a las del ducto normal.

En el año 1994⁸⁶, Ni Y *et al* realizaron un estudio utilizando técnicas colangiográficas y observaron colaterales neoformadas que serían las responsables del restablecimiento del flujo biliar. Aparecían al transcurrir 4 semanas desde la ligadura del colédoco, lo que coincide con los trabajos publicados por Wright JE *et al*, en 1962⁵⁵ y 1964⁵⁶.

A raíz de trabajos en los que se evidenciaba el restablecimiento del flujo por la formación de colaterales, en 1995, Castro e Silva O *et al*⁷⁸ idearon un modelo en el que se impedía dicha proliferación extrahepática. Realizaron la ligadura del colédoco a 5 mm de la inserción del conducto pancreático mayor, efectuando 5 nudos, es decir, ocupando mayor superficie de ligadura, y originando de esta forma un área fibrótica incapaz de emitir ninguna proliferación de ductos.

Respecto a la estructura del colédoco proximal hipertrofiado, cabe decir que los 13 casos estudiados mostraron una morfología semejante. El epitelio superficial de revestimiento de la mucosa está conservado y comprimido, pasando de una morfología cilíndrica alta a un epitelio cilíndrico bajo. Esta situación se denomina hipotrofia por compresión del fluido contenido. Se explica así la dilatación intraluminal del colédoco. Igualmente se produjo una fibrosis parietal discreta junto a un infiltrado linfohistiocitario disperso.

Gulik TM *et al*, en 1988⁸⁷, obstruyendo el colédoco de conejos mediante ligadura, observaron como se producía la degeneración del epitelio de dicho conducto en su zona craneal. Achacaron el daño producido a la acción de las sales biliares acumuladas y a la elevada presión intraluminal.

Wright JE *et al*⁵⁵ sugieren que el colédoco craneal no tiene capacidad para emitir conductos, dada la estructura atrófica que presenta. Apoyan la teoría de que "...dado que el colédoco deriva del divertículo hepático y crece en dirección centripeta —caudo-craneal—, si se secciona, puede que se mantenga ese potencial embriológico en cuanto a dirección de crecimiento...". Sin embargo, Ni Y⁸⁶ *et al* confirman, mediante estudios colangiográficos e histológicos, la existencia, en una fase crónica, de múltiples túbulos epiteliales extrahepáticos a ambos lados de la ligadura capaces de reiniciar la coleresis.

En la zona craneal de los 13 colédocos correspondientes a las 13 ratas supervivientes se observa una discreta proliferación de ductos, sobre todo en la serosa. Estos resultados corroboran los obtenidos por Moratinos P *et al*, en 1989⁸⁸. Describen estos autores, en un estudio morfológico realizado en las mismas condiciones que las del presente trabajo, como "...la proliferación de ductos biliares no solo se presenta a nivel intrahepático sino en la zona proximal y extrahepática del colédoco distendido...".

En 3 de los 13 casos expresados (23%), tanto el tamaño de algún ducto proliferado, como la situación de intimidad con la serosa del colédoco, hace pensar en una mayor relación estructura-función entre ambos conductos biliares, pero se desconoce en donde se genera. Cabe resaltar que en 2 de estos 3 casos, la proliferación de ductos es mayor en la zona del colédoco colindante con páncreas, sin observarse contenido biliar en éste. Estos resultados están en la línea de los obtenidos por Cameron GR *et al*⁸² y Ni Y *et al*⁸⁶, que ubicaron dichos conductos de neoformación en el interior del tejido pancreático o incluidos en el tejido laxo que rodea a la ligadura. Los mismos autores sugirieron la participación de estas estructuras en la proliferación de los conductos. Este extremo no se ha podido confirmar en el presente trabajo, con la salvedad de que como *up supra* se menciona, no se encuentran pigmentos biliares en tejido pancreático. Ello permite sugerir la no implicación de esta estructura, al menos de forma directa, excepto en lo que le concierne como sostén de dichos conductos neoformados.

Una observación común, tanto en el estudio actual, como en el de todos los

demás reseñados, es la coexistencia de la dilatación forzada del colédoco con el restablecimiento del drenaje por colaterales (Ni Y *et al*, 1994⁸⁶). Se sugiere que el motivo de esta distensión pueda residir en la incapacidad histológica para conseguir la reversión estructural del colédoco primitivo; en un insuficiente tiempo de observación; en un escaso diámetro luminal del conducto neoformado para drenar todo el fluido biliar acumulado; o en la concurrencia de varias de estas u otras razones.

Respecto a la estructura hepática de las ratas supervivientes hay que mencionar que, en los 13 casos, no se detectaron alteraciones de importancia, salvo una discreta proliferación ductal en los espacios porta y un mínimo infiltrado linfohistiocitario. En 1 caso, de los 13, el hígado presentaba 3 ductos lobulares con proliferación ductal de canalículos, como si fueran gemaciones de ellos.

Los resultados de este tratado coinciden con los de todos los autores mencionados en el apartado. Se refieren al restablecimiento de la morfología hepática normal y a las secuelas que se han decrito. Cameron *et al*, en 1960⁸², señalaban como, "...una vez restablecido el flujo biliar, desaparecen el estasis biliar, la proliferación ductal y la fibrosis hepática, retornando una morfología hepática normal...".

V.2. ESTUDIO MORFOLÓGICO

V.2.1. Hígado

V.2.1.1. Observaciones macroscópicas

Los hígados procedentes de ratas sacrificadas en periodos semanales –serie experimental–, y los de las muertas de forma espontánea –serie de supervivencia–, presentaron durante los primeros 19 días, un aspecto macroscópico congestivo que, posteriormente, se hacía claramente nodular –moteado al corte–. Marinelli A *et al*, en 1995⁸⁰, obtienen los mismos resultados.

V.2.1.2. Observaciones microscópicas

La totalidad de las imágenes macroscópicas de hígados congestivos obtenidas coincidieron con otras, microscópicas, de congestión vascular. La congestión vascular es secundaria a la colestasis denominada de "tipo pasivo", y se produce por la dificultad en el desagüe venoso –la retención de bilis afecta mecánicamente a la dinámica sanguínea– (Farreras *et al*, 1996¹²).

Al observarse microscópicamente los hígados de aspecto nodular, se comprobó que las imágenes correspondían siempre, a una morfología cirrótica o precirrótica, aspecto que se considera en el apartado V.2.1.2.3.

V.2.1.2.1. Proliferación de ductos biliares

Este apartado refleja, única y exclusivamente, la proliferación de colangiomas a nivel intrahepático.

Los resultados evidencian cómo la proliferación de estos conductos se hace patente a partir del 4º día de colestasis, y no antes. Con posterioridad, se revela un incremento progresivo que alcanza un máximo a los 14 días, manteniéndose hasta el final de la experiencia. Son resultados que coinciden con los obtenidos por Franco D *et al*, en 1979⁵², no obstante estos autores detectaban un aumento moderado de la proliferación biliar en los días posteriores a la 2ª semana de colestasis.

Los resultados del presente trabajo se sitúan en la línea de los publicados por Moritz M *et al* (1972⁵⁰), donde colocaron el supradicho máximo a los 18 días postligadura; localizaron el inicio de la proliferación ductal a partir del 1º día de ligadura del colédoco.

Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹, observaron la presencia de figuras mitóticas en el epitelio de los referidos ductos, más marcada en la 1ª semana que en las sucesivas, y con un mayor daño celular, en este tejido, durante este mismo periodo de tiempo. Citan estos mismos autores como entre los 29 y 40 días de colestasis se produce, ocasionalmente, la división del parénquima hepático por la propia proliferación ductal.

Este extremo se ha puesto de manifiesto, en el experimento actual, donde se observa a partir de la 2ª semana de ligadura, cómo la proliferación ductal progresa más allá de los espacios porta, uniéndolos entre sí a través de los ductos proliferados. Kountouras J *et al*, 1984⁵³, en la misma línea, manifestaron que a partir de los 10 días de colestasis, la proliferación de colangiomas se extendía por fuera de los límites de las áreas portales, invadiendo el parénquima hepático. Este es el signo más característico de una obstrucción biliar extrahepática (Poulsen C, 1970⁸⁹).

No se conoce bien el mecanismo desencadenante de esta proliferación de ductos. Schaffner F *et al*⁹⁰, abogaban por la presencia de un material con capacidad de estimulación del crecimiento. Esta sustancia era, probablemente, la responsable de la reacción inflamatoria periductular. En 1980, Martin AS *et al*⁹¹, observaron que el



incremento ductal era debido: por una parte, al aumento de la propia presión intraluminal, haciendo que los conductos ya existentes fueran más tortuosos; y por otra, a la proliferación secundaria a la inflamación. Llegaron incluso a imputar al ácido litocólico –componente de la bilis–, el ser causante de la inflamación ductular postcolestásica y de desencadenante de los fenómenos de proliferación ductal (Martin AS *et al*⁹¹).

V.2.1.2.2. Fibrosis periductal e intralobulillar

En la 2ª semana postcolestasis, la proliferación fibrilar se tornó de discreta a de moderada intensidad. Kountouras J *et al*, en 1984⁵³, la calificaron, durante este mismo periodo de tiempo, de importante, con desarrollo de tejido conectivo fibroso que unía las áreas portales. Por tanto, en esta 2ª semana se desorganiza la estructura lobulillar, sin quedar, todavía, definidos los nódulos típicos de la cirrosis.

En las semanas posteriores aumentó, progresivamente, para alcanzar un máximo a los 21 días, valor que mantuvo y aumentó aún más durante el resto del experimento.

En 26 de los 78 casos con fibrosis (33%) se produjeron fibrosis muy importantes. Este porcentaje coincidió con aumento de la hepatonecrosis y del infiltrado inflamatorio en los tractos intralobulillares. La presencia de un infiltrado celular inflamatorio en el estroma había sido descrita por Johnstone JMS *et al* en 1976⁵¹, constituido por linfocitos, monocitos y fibroblastos. Todo ello dio lugar a nódulos de regeneración de pequeño tamaño, rodeados de abundante fibrosis colágena (cirrosis micronodular).

A partir de los 21 días no se aprecia relación entre la fibrosis intralobulillar y la proliferación ductal. La proliferación ductal no parece estar directamente relacionada con el tiempo de ligadura, sino con factores no determinados tales como mayor hepatonecrosis y mayor infiltrado inflamatorio crónico linfo-histio-plasmocitario.

Se detecta una fuerte relación en el 67% (52 de 78 casos) de casos de fibrosis con la proliferación ductal. En estos casos, la fibrosis rodea, directamente, a los conductos proliferados –fibrosis periductal–. La intensidad de esta fibrosis es menor que la del otro 33%. Análogos resultados obtuvieron Kountouras J *et al*, en 1984⁵³, describiéndola como fibrosis periductal concéntrica y detectándola a los 10 días postcolestasis –30 días según Tsukamoto H *et al*, en 1990⁸⁵–.

Destaca pues en este 67% la proliferación ductal sobre la fibrosis. En una 3ª parte de este 67% la fibrosis no solo conquista los espacios porta, sino que los une, unos con otros, por invasión de los lobulillos hepáticos. Sin embargo, Tsukamoto H *et al*, en 1990⁸⁵, estimaron que la fibrosis periportal solo se manifestaba a los 30 días desde la ligadura del colédoco.

V.2.1.2.3. Cirrosis

Se consideraron hígados cirróticos aquellos que cumplían con los requisitos indicados en el apartado IV.4.1.1.2.3.

No se observó ningún caso de cirrosis hasta transcurridos 14 días por lo menos, desde la ligadura y sección del colédoco. A partir de los 22 días se instauró en el 100% de los casos.

Las primeras publicaciones de Cameron GR y Hassan SM, en 1958⁴⁷, al respecto, señalaron que el cuadro cirrótico aparecía entre los 22 y 35 días de colestasis. Posteriormente, otros autores como Mc Donald RA *et al*, en 1961⁴⁸; Cartter M, en 1966⁴⁹; Moritz M *et al*, en 1972⁵⁰; Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹; Franco D *et al*, en 1979⁵²; establecieron dicho intervalo entre los 14 y 40 días postligadura.

Autores como Tsukamoto H *et al*, en 1990⁸⁵, dijeron no haber encontrado después de la ligadura del colédoco morfologías cirróticas según la definición establecida por Conn HO *et al*, en 1987¹⁴ –únicamente aquellas que presentaban nódulos de regeneración y aumento del tejido conectivo, dando lugar a una desorganización difusa de las estructuras lobulillar y vascular hepáticas–. Si las encontraron a partir de los 30 días de colestasis, advirtiendo imágenes de fibrosis periportal.

Kountouras J *et al*, en 1984⁵³, afirmaron que la obstrucción del colédoco superior a 15 días conduce a cirrosis. Señalaron igualmente, que después de 28 días de colestasis, el 70% de los procesos cirróticos eran del tipo descompensado –presencia de líquido ascítico–, y si el tiempo de obstrucción biliar superaba los 30 días, la descompensación se instauraba en un 100% de los casos.

La descompensación de la cirrosis no es exclusiva del modelo experimental quirúrgico. Proctor E, junto a distintos autores, y en estudios publicados en 1983⁹², 1982²⁷ y 1984⁹³, obtuvieron el 72% de cirrosis descompensadas merced a dispensación intragástrica de tetracloruro de carbono.

La aparición de líquido ascítico fue notable en el transcurso del presente trabajo. No obstante, no se investigó en profundidad este dato por no ser objetivo de estudio, aunque se considera importante la mención de su existencia.

En conclusión, se puede afirmar que existe gran similitud entre los resultados del este trabajo y los de la mayoría de los investigadores anteriormente mencionados.

De las 100 ratas de la serie de evolución patológica, se consiguieron un total de 50 casos de cirrosis. Se hace constar que en este 50% de ratas cirróticas se incluyen tanto las muertas de forma espontánea, como las sacrificadas en intervalos semanales. Estas últimas, de no haber sido sacrificadas premeditadamente, podrían haber incrementado dicho tanto por ciento, y por ende la rentabilidad del modelo experimental.

Kountouras J *et al*, en 1984⁵³, observaron que las imágenes de cirrosis que aparecían a partir de los 15 días de colestasis, estaban relacionadas con zonas edematosas y de proliferación ductal, produciéndose igualmente la unión de parénquima y septo característica de la cirrosis biliar humana.

En el presente estudio, se estableció la imagen anterior descrita por Kountouras J *et al*⁵³, en 24 casos de los 50 casos con cirrosis, esto es, el 48%, destacando la proliferación de ductos con gran fibrosis periductal. El perfil cirrótico era, pues, semejante al de la cirrosis biliar secundaria en la obstrucción de la vía biliar principal del hombre.

Los 26 casos restantes –que constituían el 52% de los 50 casos con cirrosis objeto de estudio– ofrecieron una imagen microscópica en la que predominaba marcada fibrosis de colágena, ajena en gran parte a la proliferación ductal y desaparición de las venas centrolobulillares, dando todo ello como resultado, una desestructuración hepática máxima. Estos 26 casos guardan un parentesco morfológico con la cirrosis micronodular postalcohólica humana. Este aspecto no se encuentra descrito en la bibliografía consultada, pero se quiere resaltar que no se trata de casos aislados sino de más de la mitad de las cirrosis conseguidas.

V.2.1.2.4. Infiltrado inflamatorio periductal y portal

Salvo algunas excepciones, el infiltrado celular inflamatorio fue de moderada intensidad.

Las ratas muertas de forma espontánea, tras 24 horas desde la ligadura y sección del colédoco, mostraban un discreto infiltrado de tipo inflamatorio, diseminado por todos los lóbulos, y ligado a zonas de necrosis hepatocelular. Schaffner F *et al*, en

1969⁹⁰, señalaron cómo la necrosis hepatocelular producía una inflamación intralobulillar y portal.

Estaba constituido, fundamentalmente, por linfocitos, histiocitos y por algunas células plasmáticas. Al mismo resultado llegó Moritz M *et al*, en 1972⁵⁰, afirmando que se trataba de un infiltrado inflamatorio de tipo focal postnecrosis.

A los 4 días de colestasis, el infiltrado alcanzó unos niveles moderados, mantenidos durante el resto de la experiencia, a excepción del grado intenso que mostraron 4 ratas a los 22 días y 3 ratas a los 27 días, todas muertas de forma espontánea. El infiltrado era periductal, correspondiendo al de una colangitis discreta, con predominio de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Éstos se localizaban alrededor de los ductos, en el tejido conectivo portal y en los tractos fibrosos intralobulillares e internodulares. En escasas ocasiones, su situación era intraductal, también ligada a colangitis.

Kountouras *et al*⁵³, encontraron en sus experimentos, también, bajos niveles de infiltrado inflamatorio. Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹, los relacionó con una baja incidencia de infección, al no observar apenas infiltración neutrofílica, en las áreas portales, asociada a los conductos biliares.

Franco D *et al*, en 1979⁵², describió igualmente como moderada la infiltración de polimorfonucleares en las áreas portales en una obstrucción biliar prolongada.

El incremento habido a los 22 y 27 días postcolestasis pudiera estar relacionado con la conjunción del aumento de ductos biliares, fibrosis a su alrededor y a la aparición de la patología cirrótica.

En el presente estudio no se detecta ninguna conexión, ni siquiera temporal, entre la mayor proliferación de colangiomas y el incremento paralelo del infiltrado inflamatorio, Schaffner *et al*, en 1969⁹⁰, sí observaron dicha coincidencia cuya responsabilidad atribuyeron a un material con capacidad de estimulación del crecimiento, la responsabilidad, tanto de la proliferación ductal, como de la reacción periductular inflamatoria. Martin *et al*, en 1980⁹¹, asociaban esa competencia a la reabsorción de componentes irritantes de la bilis, como el ácido litocólico. Estos autores vieron como la degeneración plumosa del hepatocito se debía a la retención de ácidos biliares, lo que daba lugar a la correspondiente necrosis con inflamación reactiva local.

V.2.1.2.5. Proliferación de fibroblastos

Se detectó incremento discreto de fibroblastos a los 6 días de la ligadura y sección del colédoco; aumentó su presencia a los 14 días; y se trocó en intensa a partir de los 21 días de la colestasis, situación que se mantuvo hasta el final del periodo experimental.

Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹, observaron la presencia de este tipo celular en el estroma después de la ligadura del conducto biliar en ratas. Únicamente señalaron su incremento, situándolo entre los 9 y 28 días, pero sin detallar el grado en el que se manifestaba.

La proliferación de fibroblastos transcurrió paralela a la fibrosis hepática, dado que la síntesis de estas fibras –principalmente colágena– corre fundamentalmente a cargo de esta estirpe celular; y algo retrasada respecto a la proliferación ductal.

Como se señaló en el apartado referente a la fibrosis periductal e intralobulillar, el 73% de los casos de fibrosis están asociados con la proliferación de ductos biliares, y, en consecuencia, con la proliferación fibroblástica.

V.2.1.2.6. Edema portal y hepatocitario

El edema celular, cuando se presentó, fue muy discreto. El aumento del volumen celular –tumefacción turbia– se observó en los días posteriores al acto quirúrgico desencadenante de la colestasis, observándose en todas los casos de muerte espontánea.

Se contempló edema hepatocitario y en áreas portales de gran intensidad, entre la 3ª y 4ª semanas, ligado, probablemente, al establecimiento de la patología cirrótica en el 100% de los casos y a la ausencia de líquido ascítico, que inicia su aparición a partir de la 4ª semana (Kountouras J *et al*, 1984⁵³).

V.2.1.2.7. Binucleación hepatocitaria

Es una imagen constante en todos los hígados sometidos al estudio morfológico que sigue a la ligadura del colédoco. Lo es a las 24 horas, en grado discreto, y, por lo menos, desde los 4 días hasta el final de la experiencia, en grado moderado.

Este hecho se relaciona directamente con la regeneración hepática, como consecuencia de la alta capacidad de división de los hepatocitos, estimulada por la degeneración del tejido del que forman parte.

Autores como Moritz M *et al* en 1972⁵⁰, Johnstone JMS *et al* en 1976⁵¹ y Kountouras J *et al* en 1984⁵³, evidenciaron esta circunstancia. Observaron cómo, en la primera semana, aparecía gran número de hepatocitos dañados con una actividad mitótica incrementada. Afirmaban que el estímulo que producía esta capacidad extra de división celular residía en la propia degeneración del hepatocito, como mecanismo natural de supervivencia.

Coincidían los mismos al advertir la constancia en el grado de división celular a lo largo de sus respectivos periodos experimentales.

V.2.1.2.8. Vacuolización nuclear hepatocitaria

La vacuolización, o degeneración vacuolar, nuclear fue un hallazgo irregular de discreta intensidad. Los resultados obtenidos y la nula referencia que al aspecto realizan todos los autores consultados, no pueden sino testimoniar la escasa importancia del mismo.

V.2.1.2.9. Necrosis hepatocitaria

A las 24 horas de provocada la colestasis quirúrgica mostraron una discreta necrosis hepatocitaria (18 casos). Durante el resto de la experiencia, la necrosis hepatocitaria fue moderada (82 casos).

Las necrosis iniciales, como señalara Moritz M *et al*, en 1972⁵⁰, fueron de carácter focal y diseminadas por todos los lobulillos, con infiltrado inflamatorio linfohistiocitario en áreas necróticas.

Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹, observaron que la obstrucción del colédoco originaba gran cantidad de hepatocitos dañados –degeneración celular–, pero raramente zonas de necrosis. A partir de los 29 días de colestasis advirtieron cómo los hepatocitos “estallaban,” dando lugar a necrosis hepatocitaria de distribución esporádica, sin guardar relación alguna con la arquitectura lobulillar

En el presente estudio no se advirtió, en ningún caso, un grado intenso de necrosis hepatocitaria.

En los casos correspondientes a los 21 y 27 días de colestasis se detectó una degeneración plumosa hepatocelular o de infarto biliar periportal. Esta imagen es típica de los procesos cirróticos humanos, secundarios a la obstrucción de grandes ductos.

Muchos niegan su aparición en la colestasis quirúrgica experimental, mientras que otros muchos autores no recogen este cambio en sus estudios experimentales.

La necrosis hepatocitaria adquiría mayor envergadura cuanto más importante era la fibrosis perinodular. No se han reflejado estos hallazgos en los resultados dado que se trataba de situaciones muy específicas.

En raras ocasiones se presentaron cuerpos de Mallory –“...agregados de microfilamentos por alteraciones del citoesqueleto hepatocelular, debido al efecto antitubulínico, reteniéndose las proteínas secretadas por el hepatocito en depósitos citoplásmicos hialinos...” (Martin *et al*, 1980⁹¹)–, así como necrosis hepatocítica eosinofílica. Ambas imágenes son formas de degradación del hepatocito, que se hace afuncional, produciéndose su degeneración.

V.2.1.2.10. Proliferación de células de Von Kupffer

Hasta transcurridos 6-7 días desde la ligadura del colédoco –9 según Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹–, no se manifestó proliferación de células de Kupffer siendo, en cualquier caso, discreta su proporción. Posteriormente se incrementó su presentación, experimentando, en la tercera semana, una marcada presencia. Coincidió este aumento tan patente con la aparición del síndrome cirrótico en el 100% de los casos.

Aparte de la hiperplasia de estas células reticuloendoteliales, se advirtió su hipertrofia, probablemente debida a su gran actividad macrofágica –sistema macrofágico mononuclear–.

Esta proliferación celular se debe, fundamentalmente, al incremento de material de deshecho a eliminar –necrosis hepática– y al aumento de las sustancias antigénicas en la circulación sistémica, secundario al fallo del flujo enterohepático tras la ligadura del colédoco. Todo ello estimula, entre otros, el sistema macrofágico hepático.

V.2.1.2.11. Estructura lobulillar

La arquitectura del lobulillo hepático se mantuvo durante la primera semana de colestasis. Autores como Kountouras J *et al*, en 1984⁵³, observaron esta estabilidad estructural durante los 5 primeros días.

Posteriormente, en el presente trabajo, la totalidad de los hígados estudiados mostraban esta imagen alterada, tanto más cuanto mayor era el tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica. La máxima desestructuración la presentaban los hígados cirróticos, dada la presencia de septos de tejido fibroso que se extendían, frecuentemente, dentro del lobulillo, desencadenando su desorganización estructural.

Los nódulos típicos de la cirrosis no se detectaron hasta los 14 días –a los 15 días según Kountouras J *et al*, en 1984⁵³–, mostrándose de forma constante a partir de los 22 días.

Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹, señalaron cómo a medida que avanzaba el tiempo de colestasis, se incrementaba la desestructuración lobulillar. Observaron cómo los hepatocitos “estallaban” dentro de los nódulos de regeneración neoformados.

V.2.2. Colédoco

V.2.2.1. Examen macroscópico

Los colédocos procedentes de ratas sacrificadas en periodos semanales mostraban dilatación quística con gran aumento de tamaño, tanto más cuanto mayor era el tiempo de colestasis. El mismo hecho se apreció con los provenientes de las ratas muertas de forma espontánea, aunque algunos estaban rotos, tal vez debido a la presión intraluminal, o quizá a la dehiscencia de la sutura.

Esta hipertrofia ya había sido descrita por Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹ –que

apreciaron igualmente el aumento del estroma-, y por Accatino L *et al*, en 1979⁹⁴.

V.2.2.2. Examen microscópico

Las paredes del colédoco aparecieron carentes de la cubierta epitelial –denudadas–, originando áreas de necrosis celular, a diferencia de los colédocos de las ratas sobrevivientes, de la serie de supervivencia, en las que se mantenía el epitelio de revestimiento de la mucosa, aunque comprimido.

Al igual que el contenido luminal, la pared de todos los colédocos estudiados presentó en su superficie luminal, un infiltrado inflamatorio agudo ligado a colangitis –leucocitario polimorfonuclear neutrofílico–; y a partir de los 7 días, a nivel intraparietal, un infiltrado inflamatorio mixto (crónico-agudo) –histio-linfocitario–, con aislados neutrófilos, así como proliferación fibroblástica.

La serosa mostró grados variables de fibrosis, más acusado cuanto mayor fue el tiempo de colestasis.

V.2.2.3. Contenido biliar

V.2.2.3.1. Examen macroscópico del contenido biliar

A consecuencia de la ligadura del colédoco se produjo un acúmulo del contenido biliar. Su aspecto era verdoso, debido a la oxidación de la bilirrubina –biliverdina–; a veces era fluido; otras, grumoso. Estas mismas observaciones fueron descritas por Johnstone JMS *et al*, en 1976⁵¹.

Frecuentemente se observó, sobre todo a partir de los 28 días, un contenido grisáceo e incluso seroso –como en el hydrops vesicular–, debido, probablemente, a la hipersecreción mucosa de las vías biliares.

Por otra parte, se puede afirmar que la colestasis incrementa muy significativamente el volumen de contenido biliar en el colédoco hipertrofiado; y que corresponde a la práctica quirúrgica, en un 76%, la manera de producirse ese aumento a lo largo del tiempo. Cameron GR *et al*, en 1960⁸², determinaron el máximo volumen de contenido biliar en 20 ml a los 28 días. Esta cantidad fue la recogida en el experimento que ahora se presenta a los 42 días postligadura del colédoco, mientras el volumen de bilis correspondiente a los 28 días fue de 3,5(2,2) ml, muy por debajo de lo publicado por dichos autores.

El diagrama de cajas muestra como el incremento del contenido biliar en el colédoco hipertrofiado es, durante el desarrollo de la experiencia, una función exponencial, siendo únicamente significativo en las 2 últimas semanas. Respecto a este extremo, hay que mencionar que, la retención biliar por parte del colédoco, durante las primeras semanas no es significativa, debido, fundamentalmente, a la dispersión de los resultados.

V.2.2.3.2. Examen microscópico del contenido biliar

En la observación microscópica del contenido biliar, se aprecia que está constituido por bilis, células necróticas y un infiltrado purulento, formado por leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

La presión intraluminal, contribuyó a denudar la mucosa interior del colédoco produciéndose en consecuencia la necrosis de sus células, y, secundariamente, el infiltrado purulento anteriormente mencionado.

V.2.3. Bazo

Se advierte, tanto en los bazos procedentes del sacrificio semanal de ratas, como en los de las muertas de forma espontánea, un claro aspecto congestivo. Esta congestión, definida por los estudios microscópicos como congestión vascular, es la consecuencia de

la hiperhemia secundaria al fallo de la circulación enterohepática, que, a su vez, origina una hipertensión portal. Los hallazgos fisiopatológicos del presente estudio, están corroborados por los trabajos de Sherlock S, en 1974⁹⁵; Nachbauer CA *et al*, en 1981⁹⁶, y Proctor E *et al*, en 1983⁹².

Aparte de la mencionada congestión vascular, se observa un marcado hiperesplenismo, como igualmente señalan Ohara N *et al*, en 1993⁹⁷, y Marinelli A *et al*, en 1995⁸⁰.

V.2.4. Riñones

Las ratas muertas de forma espontánea, después de la ligadura del colédoco, presentaron necrosis tubular aguda isquémica, agravada, en determinados casos, por afectación del cortex renal. Estas imágenes histológicas son achacables a alteraciones *post mortem*, puesto que las necropsias se efectuaron en tiempos no inferiores a las 12 horas del *exitus letalis*.

Por otra parte, la imagen histopatológica advertida, en las ratas sacrificadas en intervalos semanales, correspondía a congestión vascular. Se apreció la coexistencia de áreas de necrosis, relacionada su abundancia con la prolongación del tiempo de colestasis. Esto coincide, paralelamente, con un proceso cirrótico, en el 100% de los casos, de los hígados estudiados a partir de los 21 días de colestasis. Se sugiere, pues, la existencia de una correlación entre la frecuencia y grado de necrosis tubular y la agravación de la hepatopatía cirrótica.

La necrosis tubular es frecuente en las enfermedades hepáticas y biliares (Epstein M, 1988⁹⁸).

La patogénesis de la necrosis tubular aguda, en sus diversos grados, subsecuente al síndrome de cirrosis hepática, evidencia, objetivamente, su origen funcional. Se han aportado numerosas sugerencias, más bien complementarias que excluyentes: el efecto del sistema renina-angiotensina que desencadena vasoconstricción renal, con la consiguiente reducción del filtrado glomerular –insuficiencia renal– (Epstein M, 1988⁹⁸); el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático que provoca la disminución del volumen sanguíneo efectivo en los riñones y en otros lugares, y que contribuye a la insuficiencia renal en la cirrosis (Epstein M, 1988⁹⁸); la posible participación de la endotoxina sistémica en la patogénesis de la insuficiencia renal en la cirrosis, puesto que actúan potentes vasoconstrictores renales (Lier H *et al*, 1983⁹⁹).

Además de las etiologías reseñadas, ha de tenerse en cuenta que algunas de las imágenes de necrosis tubular, encontradas en las piezas anatómicas de las ratas muertas de forma espontánea, podrían corresponder, como ya se dijo, a alteraciones *post mortem*.

V.2.5. Pulmones

La primera publicación científica que exponía la interrelación entre la cirrosis y la presencia de neumopatías data de 1884.

En el presente estudio, la observación macroscópica de estos órganos evidenció su fuerte aspecto congestivo. Bajo el microscopio se advirtió su correspondencia con un cuadro de congestión vascular.

El sustrato patológico de esta entidad es la vasodilatación pulmonar precapilar y la presencia de comunicaciones arteriovenosas capilares. Esta observación fue descrita en 1967 por Karlsh AJ *et al* que, a través de estudios *post mortem* en pacientes humanos, contemplaron la dilatación de los vasos capilares pulmonares (Vargas V, 1997³).

En cuanto a la patogenia de la congestión vascular, Eriksson LS *et al*, 1990 estimaron, entre otras razones, que la disfunción hepática podría favorecer la presencia

de factores vasodilatadores circulantes –originados en la circulación mesentérica–, fallando su aclaramiento y metabolización por causa del deterioro hepático (Vargas V, 1997³).

La inflamación de las estructuras bronquiales –bronconeumonía– fue un hallazgo prácticamente constante –94%– en todos los pulmones estudiados, tanto en los procedentes de las muertes espontáneas, como en los de los sacrificios semanales. Algo menos de la mitad de dichas morfologías bronconeumónicas –42%–, coexistían con otras de edema agudo de pulmón, caracterizado por gran acúmulo de infiltrado seroso gaseoso en el tejido pulmonar y debido, probablemente, a la hipotensión secundaria a la vasodilatación.

Las imágenes enfisematosas y atelectásicas, asociadas a un 7,5% de las bronconeumías, eran consecuencia del “atrapamiento” gaseoso derivado del propio edema y del ulterior colapso de estas zonas.

V.2.6. Derrames hemáticos: peritoneales, torácicos y en la luz intestinal

En general, se puede afirmar que la presencia de hemorragias, después de la ligadura del colédoco, es consecuencia de la hipertensión vascular –por hipertensión portal–, con rotura capilar diseminada (Kountouras J *et al*, 1984⁵³)

En el trabajo que se ofrece, coincidieron con todos los casos de muerte espontánea. Los ocurridos en la cavidad torácica, aparecieron solamente en las ratas muertas de forma espontánea y durante los primeros 6 días de colestasis.

La presencia individual o simultánea de ambos tipos de derrame en ratas muertas de forma espontánea, sugiere que pudieron ser la causa del fallecimiento.

En lo concerniente a las hemorragias digestivas cabe destacar su escasa incidencia, pero que coincide en todos los casos, con tiempos de colestasis en los que la cirrosis se encontraba ya instaurada –posterior a los 21 días–. De los 50 casos de cirrosis diagnosticados, solo 3 presentaron hemorragias digestivas.

El aumento de la resistencia del flujo sanguíneo a través del hígado, provoca un aumento de la presión del sistema porta. El incremento en la presión portal favorece, además del desarrollo de ascitis, la rotura de venas, en especial las esofágicas, lo que desencadena una hemorragia digestiva grave (Pons F, 1997¹⁰⁰). La hemorragia digestiva por rotura de varices esofágicas es la causa mas frecuente de las hemorragias digestivas en la cirrosis hepática, pero no es la única. Existen causas menos frecuentes ligadas a la rotura de varices en otras localizaciones digestivas, gastritis erosiva, etcétera (Vargas V, 1997³).

V.3. ESTUDIO FUNCIONAL

V.3.1. Bioquímica sérica

V.3.1.1. Alteraciones enzimáticas

La elevación sérica de las distintas actividades enzimáticas, es la consecuencia de la necrosis celular y de la liberación de enzimas en el torrente sanguíneo, a lo que se añade su emisión por parte de las células dañadas, donde la síntesis enzimática puede continuar (Curtis JS *et al*, 1972¹⁰¹).

La actividad enzimática sérica es el resultado de una complicada función celular de síntesis-degradación, permeabilidad de membrana, localización intracelular del enzima y aclaramiento plasmático.

V.3.1.1.1. Creatin fosfo kinasa (CPK)

La creatin fosfo kinasa sérica se incrementa muy significativamente a la semana de la ligadura y sección del colédoco, que después se normaliza.

Al tratarse de una proteína predominantemente muscular –su elevación evidencia esencialmente necrosis del músculo esquelético y miocárdico–, cabría esperar que el incremento manifestado sería debido a la herida quirúrgica realizada sobre la musculatura abdominal, y no a la ligadura del colédoco y a sus consecuencias secundarias.

La laparotomía fue la causante del incremento de la actividad CPK durante esta 1ª semana de colestasis, como así se deduce del análisis estadístico correspondiente.

V.3.1.1.2. Gamma glutamil transpeptidasa (GGT)

Aunque la GGT no es exclusiva del hígado –también se encuentra en riñones, páncreas, bazo y pulmón–, abunda en los hepatocitos. Dentro de estas células se ubica en la membrana de los microsomas y del retículo endoplásmico liso, así como en los conductillos biliares. Los valores séricos de GGT aumentan en casi todas las hepatopatías, por lo que su valoración tiene alta sensibilidad, pero poca especificidad (Rodríguez DB *et al*, 1996¹⁰²). No obstante, esta actividad se encuentra muy elevada en procesos colestásicos (Rodríguez DB *et al*, 1996¹⁰²), constituyendo un buen indicador de dichos procesos patológicos (Pons F, 1997¹⁰⁰).

En el presente estudio, esta actividad se incrementó durante todo el periodo de observación.

El aumento significativo de la actividad GGT en el primer control semanal no puede ser debido a la laparotomía, –como ocurre con las enzimas sitas en la musculatura esquelética–, sino a los efectos de la anestesia y de la colestasis. Parece razonable que sea la anestesia –con éter etílico– la responsable de dicho incremento dado que en las 2 semanas siguientes, los valores enzimáticos de la GGT son compatibles con la normalidad. Hay que tener en cuenta que la GGT presenta marcada labilidad al ser inducida por tóxicos (Pons F, 1997¹⁰⁰).

A partir de la 4ª semana –en la 3ª semana Muriel P *et al*, en 1994⁵⁷, observaron valores para esta actividad enzimática de hasta 9 veces mayores que los de la serie de control– se aprecia incrementada significativamente la actividad GGT, que se mantiene elevada hasta el final del periodo experimental. Estos altos niveles enzimáticos coinciden con un periodo de daño hepatocelular y proliferación ductal máximos, con el consiguiente incremento sérico de GGT.

V.3.1.1.3. Transaminasas

En la cirrosis hepática, la actividad transaminasa se encuentra, en general, poco elevada, sin que sea incompatible un valor normal con este proceso patológico (Vargas V, 1997³). Su actividad aparece incrementada en procesos que cursan con necrosis hepatocelular (Pons F, 1997¹⁰⁰).

La elevación sérica de la actividad transaminasa no se debe solo al daño hepatocelular o a la destrucción de hepatocitos, también puede colaborar el paso de estas enzimas desde las organelas hepatocíticas a la fracción soluble, liberándose posteriormente en la circulación general; y no como consecuencia de daño del hepatocito, sino por existir un gran excedente enzimático (Judah JD *et al*, 1965¹⁰³; Schaffner F *et al*, 1971¹⁰⁴).

Es importante subrayar que la elevación del nivel de las transaminasas séricas no guarda una correlación absoluta con el grado de lesión histológica en el hígado (Rodríguez DB *et al*, 1996¹⁰²).

V.3.1.1.3.1. Aspártico transaminasa (AST)

Esta enzima –también llamada glutámico-oxalacético transaminasa (GOT)–, junto con la alanin transferasa –ALT (GPT)–, es un buen indicador de la lesión hepatocelular. Su actividad enzimática es propia del citoplasma celular y de las mitocondrias de los hepatocitos, pero no exclusiva. Se da en otros tejidos como músculos cardíaco y esquelético, riñones y cerebro. No es una característica exclusivamente hepática. En general, se encuentra incrementada su actividad en situaciones que cursan con necrosis hepatocelular, en donde se superan, incluso, valores hasta 10 veces superiores a los considerados normales, aunque sus concentraciones no guardan relación directa con la gravedad del proceso (Pons F, 1997¹⁰⁰).

Como consecuencia de la necrosis hepatocelular secundaria a los procesos colestásicos, se produce un incremento de la actividad AST (Abbruzzese AA *et al*, 1969¹⁰⁵).

En el actual estudio se ha observado el incremento de dicha actividad enzimática en la 1ª semana de colestasis, retornando a concentraciones normales a la 2ª, aumentando de nuevo en la 3ª y, ya, hasta terminar las 6 semanas de duración del trabajo.

Aunque la necrosis hepatocitaria se mostró moderada durante todo el proceso experimental completo, alcanzó suficiente entidad para provocar la acentuación de la actividad AST a partir de la 3ª semana de colestasis. Este incremento se mantuvo en niveles 4-6 veces superiores a los valores normales del control –4 veces según Castro e Silva O *et al*, en 1995⁷⁸; 2,5 veces según Marinelli A *et al*, en 1995⁸⁰–. Una situación semejante manifiesta la hepatopatía cirrótica en la especie humana, donde la actividad AST marca una intensidad del orden de 5 veces la correspondiente a la situación basal; no obstante, un valor normal de AST no es excluyente de este diagnóstico (Vargas V, 1997³).

El aumento de la 1ª semana no lo produjo la laparotomía, sino la propia ligadura y sección del colédoco, como se desprende del estudio estadístico realizado, en donde no aparecen diferencias significativas entre la serie de control y de operación simulada, y sí entre esta última y la de 1 semana de evolución patológica.

V.3.1.1.3.2. Alanin transaminasa (ALT)

Como en el apartado anterior se indica, la actividad alanin transferasa –también llamada glutámico pirúvico transaminasa (GPT)–, refleja la lesión hepatocelular. Su actividad se ubica en el citoplasma celular y en las mitocondrias de los hepatocitos. Su

determinación detecta específicamente daño hepático, ya que apenas se encuentra en otros tejidos.

Al igual que ocurre con la AST, la concentración sérica ALT no guarda relación directa con la gravedad de la hepatopatía, pero permite valorar la evolución de estos procesos nosológicos (Pons F, 1997¹⁰⁰). Este es el caso de la cirrosis humana, en que, al igual que la AST, la ALT ofrece cifras 5 veces superiores a las correspondientes a individuos normales (Vargas V, 1997³).

En el estudio que se expone, la ALT se manifiesta elevada, aunque mostrando una gran dispersión en los individuos estudiados, como lo revela el bajo coeficiente η^2 obtenido -51,5%-.

El aumento de esta actividad solo fue significativo en la 1ª, 3ª y 4ª semanas de colestasis, no superando, en ninguna de ellas, concentraciones del orden de 3 veces superior a las correspondientes a ratas en situación basal.

Hay que resaltar que las lesiones hepatocelulares habidas tras los procesos colestásicos se deben, en gran manera, a la acción detergente de las sales biliares acumuladas en el parénquima hepático.

El aumento producido a la semana de la intervención quirúrgica se debe a la ligadura del colédoco -colestasis-. Esto se desprende del estudio estadístico. En él se advierte un incremento significativo de la actividad ALT en la serie de evolución patológica en relación a los valores que toma, tanto en la serie de control, como en la de operación simulada; en la última se produce un descenso significativo respecto a los valores de la de control.

Schaffner F *et al*, en 1971¹⁰⁴, y Ni Y *et al*, en 1994⁸⁶, provocaron colestasis extrahepática por ligadura del colédoco en rata, y observaron que en los primeros días se producía un incremento de AST y ALT, que en los días siguientes se resolvía. Igualmente comprobaron que esta transitoria elevación no era asociable con signos morfológicos de daño.

Sin embargo, en el presente estudio, durante esta 1ª semana, se detecta un discreto grado de necrosis hepatocitaria.

Moritz M *et al*, en 1972⁵⁰, observaron el incremento de la actividad ALT a continuación de la ligadura y sección del colédoco en ratas y perros, aunque no lo cuantificaron.

En 1994, Zimmerman H *et al*⁷⁹, obtuvieron una concentración de ALT, en la 4ª semana, 2,5 veces los valores basales; un año más tarde, Castro e Silva O *et al* afirmaron que su incremento era de 6 veces los del grupo de control; mientras que Marinelli A *et al*⁸⁰, a los 30 días de la colestasis, no observaron variaciones significativas de esta actividad enzimática, con respecto a los valores de control.

Los resultados del presente estudio muestran un incremento de ALT para este mismo periodo de tiempo, superando 3 veces los valores normales.

Existe, por tanto, gran disparidad de resultados.

En el trabajo que ahora se expone, la dinámica de esta actividad enzimática coincide con la de la especie humana en iguales circunstancias en donde, tras procesos colestásicos, la actividad ALT es inferior a la AST (Vargas V, 1997³).

La relación AST/ALT del actual estudio está comprendida entre el rango 2,5 a 3,5. En la especie humana, y en iguales circunstancias que las del presente trabajo, una relación AST/ALT superior a 1 sugeriría el establecimiento de un proceso cirrótico (Vargas V, 1997³).

V.3.1.1.4. Láctico deshidrogenasa (LDH)

La láctico deshidrogenasa es una enzima que se halla en muchos tejidos como el hepático, el sanguíneo –hematíes–, el renal y el muscular. Se han descrito 5 isoenzimas, correspondiendo al hígado la 5ª. Pese a este último dato su determinación se realiza de forma global, lo que limita su valor como prueba hepática (Pons F, 1997¹⁰⁰).

En el actual estudio, la actividad LDH solo se apreció incrementada durante las 4ª y 5ª semanas, con valores del orden de 3 veces los considerados normales.

No se encontró, como cabría esperar, dada su ubicación muscular, ningún aumento significativo de la LDH a la semana de la intervención quirúrgica, ni en la serie de operación simulada, ni en la de evolución patológica.

Como se señala al inicio de este apartado, no es una enzima específica del hígado, sino que participa en procesos metabólicos de otros órganos y tejidos. Cabe destacar su presencia renal, ya que el daño que este órgano sufre desde el primer día de la experiencia –congestión vascular–, puede provocar la liberación de LDH a la circulación sanguínea. Así mismo, el hiperesplenismo derivado de la hipertensión portal incrementa la acción destructora que este órgano posee sobre los eritrocitos –hemocateresis–, originando la liberación, entre otras sustancias, de LDH.

Por tanto, el comportamiento sérico LDH tras la colestasis extrahepática no es estandarizable debido su inespecificidad hepática.

V.3.1.1.5. Fosfatasa alcalina (AP)

La actividad enzimática fosfatasa alcalina, plantea una situación muy distinta a la del apartado anterior. Su presentación sérica la efectúa por medio de varias isoenzimas procedentes de las membranas hepáticas, del hueso, intestino y placenta. En el hígado se encuentra en abundancia en las membranas sinusoidales y de los conductillos biliares.

En el hombre, sus valores sanguíneos se revelan muy acrecentados en las enfermedades hepáticas que cursan con obstrucción de las vías biliares extrahepáticas y en los procesos colestásicos intrahepáticos (Pons F, 1997¹⁰⁰; Rodríguez DB *et al*, 1996¹⁰²). Cuando se produce cirrosis, la AP exterioriza su incremento en un 60% a un 70% de los casos, a valores que no superan 3 veces los considerados normales. Pero si el proceso cirrótico es de etiología obstructiva biliar, esos valores se superan ampliamente (Vargas V, 1997³).

El estudio actual muestra una significativa relación entre el tiempo de colestasis y la actividad AP.

A partir de la 2ª semana, y hasta el final de las 6 que abarcan la presente experiencia, la actividad AP adquiere valores entre 2 y 3 veces los correspondientes a la serie de control.

En los trabajos de Simon FR *et al*, de 1973¹⁰⁶, se recogen incrementos de la actividad AP a las 18 horas de efectuada la ligadura del colédoco en la rata; y observaron que la actividad retornaba a valores normales durante los 5 primeros días de colestasis. El incremento inicial de la AP, inmediato a la ligadura del colédoco no es fácilmente explicable (Schaffner F *et al*, 1971¹⁰⁴). Este extremo no ha sido considerado en el actual estudio, dado el específico diseño del mismo.

Los resultados obtenidos por Schaffner F *et al*, de 1971¹⁰⁴; los de Franco D *et al*, en 1979⁵²; los de Zimmerman H *et al*, en 1994⁷⁹; los de Muriel P *et al*, en 1994⁵⁷; y los de los de Marinelli A *et al*, en 1995⁸⁰, están en la línea de lo alcanzado en el trabajo que se presenta. En todos se obtiene una “meseta” en la actividad AP con valores comprendidos entre 2 y 3 veces los correspondientes a la serie de control, mientras que Castro e Silva O, en 1995⁷⁸, obtienen una actividad enzimática sensiblemente superior –4

veces la de control-.

En los procesos nosológicos que cursan con colestasis extrahepática hay que dar una importancia decisiva a la elevación de la fosfatasa alcalina frente a cualquier otra enzima. Se han observado cirrosis biliares secundarias en las cuales, la única manifestación bioquímica de obstrucción fue la elevación de la actividad sérica AP (Franco D *et al*, 1979⁵²).

Hay que mencionar que, frecuentemente, las actividades GGT y AP corren paralelas en los procesos cirróticos no provocados por tóxicos. Este extremo se manifiesta a partir de la 4ª semana del presente modelo experimental de cirrosis.

V.3.1.2. Alteración de los sustratos metabólicos

V.3.1.2.1. Proteínas séricas totales

El hígado es el órgano más activo en la síntesis de proteínas, al ser uno de los depósitos más importantes de aminoácidos. Esta viscera es la encargada de sintetizar todas las proteínas plasmáticas a excepción de las inmunoglobulinas (Pons F, 1997¹⁰⁰).

La concentración de proteínas séricas totales tiene escaso poder diagnóstico a menos que se acompañe de la determinación de albúmina y globulinas (Balcells A, 1989¹⁰⁷).

Una de las proteínas que recorren el torrente circulatorio más relacionada con la función hepática es la albúmina.

La hipoalbuminemia es un hallazgo común en numerosas hepatopatías, como en la colestasis crónica y en la cirrosis; es el reflejo de una síntesis disminuida, dado que esta síntesis se verifica en el hígado (Vargas V, 1997³). Constituye, pues, un fiel marcador de la función sintética hepatocelular en las hepatopatías crónicas (Rodríguez DB *et al*, 1996¹⁰²).

En el presente estudio se observa que la colestasis crónica provoca un decremento muy significativo de la concentración sérica de ALB.

Se evidencia que a mayor tiempo de colestasis, mayor daño hepático y, consecuentemente, menor capacidad funcional, entre ellas de la síntesis proteica. Panduro A *et al*¹⁰⁸ señalaron la producción del bloqueo de la síntesis de la albúmina debido a su acúmulo intracelular por un problema en su secreción -regulación por retroalimentación-.

La hipoalbuminemia se mostró, durante las 6 semanas que duró la experiencia, con valores análogos durante las 4 primeras semanas y significativamente menores a las anteriores en las 2 semanas siguientes.

Marinelli I *et al*, en 1995⁸⁰, detectaron la mencionada hipoalbuminemia en el único control realizado a los 30 días de la ligadura, estableciéndola en un 40% de decremento respecto a su valor inicial.

No coinciden estos resultados con los obtenidos por Lee E *et al*, en 1972¹⁰⁹. Estos autores estudiaron la capacidad biosintética hepática valorando la albuminemia en ratas sometidas a la ligadura del colédoco, durante un total de 7 semanas, y no detectaron ningún descenso en la concentración sérica de esta proteína hasta la sexta semana. Este resultado, discrepante con el obtenido en el presente estudio, es difícilmente explicable, ya que la hipoalbuminemia es un dato común en la cirrosis hepática -reflejo de síntesis disminuida- (Vargas V, 1997³), que se establece, de modo constante, a los 22 días de la ligadura del colédoco. Esto debería justificar un decremento a partir, al menos, de la 3ª semana postcolestasis.

Los resultados del presente estudio coinciden con los observados en la especie humana. Las alteraciones en la síntesis de la albúmina se manifiestan al cabo de los 8 días

en forma de hipoalbuminemia (Pérez SP, 1978¹¹⁰). Si la obstrucción –como cita este autor– no fuera persistente, la albuminemia retornaría a límites normales.

Lo que sí es cierto es que, a tenor de los resultados obtenidos en el actual trabajo, se observa que el decremento sérico habido a la semana de la colestasis está relacionado con la intervención quirúrgica y no con los efectos colestásicos. No hay diferencias significativas entre la serie de operación simulada y la serie de evolución patológica; y sí entre la de operación simulada con la de control.

En procesos cirróticos conseguidos con el empleo de hepatotoxinas también se observó esta hipoalbuminemia inicial; y que se mantenía hasta el final de la experiencia (Proctor E *et al*, 1982²⁷ y 1983⁹²).

Al realizar la determinación de las proteínas séricas totales –albúmina incluida–, se observa que, realizada la acción quirúrgica, aquellas no acusan diferencias significativas respecto a la serie de control –test de Bonferroni–. Haber detectado un decremento en los niveles de ALB durante las 6 semanas de experiencia, con niveles normales de proteínas, significa que se ha producido un aumento del resto de éstas (Hasch E *et al*, 1967¹¹¹; Keyser JW, 1983¹¹²; Birke G, 1966¹¹³). Sin embargo, no todos los trabajos consultados coinciden en admitir la estabilidad de la concentración sérica de proteínas. Tal es el caso de Marinelli A *et al* que, en 1995⁸⁰, afirmaron detectar un decremento en la proteinemia del orden del 10% respecto a la concentración del grupo de control.

El aumento en los niveles de γ -globulinas fue un hallazgo de la presente experiencia, que se detectó en la 2ª semana y alcanzó una meseta a la 4ª. Las hepatopatías crónicas en general, y las que cursan con hipertensión portal en particular (Rodríguez DB *et al*, 1996¹⁰²), acusan un incremento en los niveles de las inmunoglobulinas, sitas en dicha fracción electroforética. Esto es debido a la imposibilidad kupfferiana para fagocitar todo el material antigénico particulado –en su mayoría bacteriano (Ginés P *et al*, 1996¹¹⁴)– procedente del intestino –por trastorno funcional (Pons F, 1997¹⁰⁰)– y que, en estas circunstancias, alcanza la circulación sistémica estableciendo contacto con las células plasmáticas inmunocompetentes (Prieto JV, en 1978¹¹⁵).

Así pues, la hiper- γ -globulinemia observada en esta experiencia refleja la reacción del sistema reticuloendotelial y no el daño de la célula hepática.

Respecto a la fracción electroforética α_1 -globulina, permaneció durante las 6 semanas por debajo de los valores normales. Este descenso se encuentra plenamente justificado por el déficit de α_1 -antitripsina –proteína de síntesis hepática que representa el 85% de esta fracción–, cuya síntesis se advierte muy reducida en los procesos cirróticos hepáticos (Vargas V, 1997³).

Por el contrario la α_2 -globulina expresó un incremento inicial en la primera semana, retornando a valores normales en la siguiente, para aumentar nuevamente en la 3ª semana hasta el fin del experimento.

A esta fracción electroforética migran glucoproteínas, entre las que destaca la macroglobulina α_2 ; y lipoproteínas α . Hay que destacar, dada la hepatopatía objetivo de estudio de este trabajo, la presencia en la fracción citada de la LDH y de la AP, entre otras enzimas. El incremento observado durante el periodo experimental de la actividad sérica AP colabora en el que muestra la α_2 -globulina.

Respecto a la fracción electroforética correspondiente a la β -globulina, cabe decir que se halla conformada por lipoproteínas, transferrina, numerosos componentes del complemento, etcétera.

En el actual estudio, esta fracción aparece incrementada de forma significativa desde la primera semana postcolestasis, manteniendo igual valor durante todo el periodo experimental. A estos mismos resultados llegaron Proctor E *et al*, en 1983⁹². Justificaron este aumento con el habido por los lípidos séricos –colesterol y triglicéridos–. Sin embargo en el presente estudio no se apreció el mencionado incremento lipídico, que no sufrió variaciones significativas durante las 6 semanas de colestasis.

V.3.1.2.2. Bilirrubinas total (TBIL) y directa (DBIL)

La bilirrubina es un buen marcador de la función hepática, gozando, incluso, de valor pronóstico en la cirrosis hepática. El incremento de los niveles séricos de este metabolito en procesos nosológicos hepáticos suele simultanearse con otro paralelo de la actividad AP (Vargas V, 1997³).

En el actual trabajo se produce un incremento muy significativo de la TBIL, que denuncia una relación causa –ligadura y sección del colédoco–, efecto –hiperbilirrubinemia–. Se aprecia igualmente la presencia de la relación paralela, anteriormente citada, entre la TBIL y la AP.

La TBIL no puede ser aclarada suficientemente de la sangre por encontrarse obstaculizada su excreción hepática –intestinal–. Sin embargo, la capacidad funcional hepatocitaria para conjugarla –en el REL del hepatocito (Popper H *et al*, 1970¹¹⁶)– con la glucuronil transferasa, para formar el diglucuronato de bilirrubina –bilirrubina directa (DBIL)–, no se ha perdido (Moritz M *et al*, 1972⁵⁰). De hecho, en las colestasis, como la del presente estudio, el incremento se produce a expensas de la forma conjugada –DBIL– (Pons F, 1997¹⁰⁰). La DBIL, al ser hidrosoluble, se elimina en la orina –urobilinógeno–.

En situaciones normales la DBIL supone 1/3 parte de la TBIL, en el hombre. En la rata no se pudo comprobar este extremo porque la técnica para la determinación de DBIL no era suficientemente sensible para valorar cantidades menores de 0,1 mg/dl, aunque Simon FR *et al*, en 1973¹⁰⁶, la establecieron en 0,2 mg/dl; Muriel P *et al*, en 1994⁵⁷, la estimaron en 0,1(0,04) mg/dl; y Marinelli A *et al*, en 1995⁸⁰, obtuvieron una concentración 0,24(0,18) mg/dl para la DBIL.

En el presente estudio, durante las 6 semanas de experiencia, la DBIL supuso entre el 50% y el 80% de la TBIL –85,5 a 88,5% para Kountouras J *et al*, en 1984⁵³; 76% para Muriel P *et al*, en 1994⁵⁷; y 70,11% para Marinelli A *et al*, en 1995⁸⁰–.

Que la capacidad para la conjugación de la TBIL no se pierde en estas circunstancias lo corroboran en sus publicaciones Moritz M *et al*, en 1972⁵⁰, y Kountouras J *et al*, en 1984⁵³. Los primeros lo comprobaron durante los 18 días que duró su estudio, mientras que los segundos lo hicieron 10 días más.

La hiperbilirrubinemia se produce a partir del 2º día de la ligadura del colédoco, estabilizándose al 3º (Schaffner F *et al* 1971¹⁰⁴). Lee E *et al*, en 1972¹⁰⁹, cuantifican el incremento a las 48 horas en 5,8(1,8) mg/dl, con unos valores basales de 0,72(0,5) mg/dl, muy por encima de los determinados en el presente estudio. No obstante, se quiere subrayar que la gran dispersión en el resultado basal –coeficiente de variación muy elevado, CV=0,69– reduce la fiabilidad del mismo.

En el actual trabajo, durante las 6 semanas que duró el mismo, se observó un valor medio de TBIL de 6,6(1,8) mg/dl; 8,1(1,7) mg/dl para Simon FR *et al*, en 1973¹⁰⁶.

Franco D *et al*, en 1979⁵², valoraron el metabolito a las 2 y a las 4 semanas de la ligadura del colédoco en ratas, con el siguiente resultado: 6,6(0,4) mg/dl y 6,4(0,3) mg/dl, respectivamente; en la línea de lo conseguido en el presente estudio –5,9(1,4) y 6,7(1,3) respectivamente–.

Marinelli A *et al*, en 1995⁸⁰, estimaron la concentración de este metabolito a los 30 días de la colestasis en 9,87 (1,99) mg/dl, en tanto que en el actual estudio fue menor a los 28 días -6,7(1,3)-, pero en la línea de lo publicado por Zimmerman H *et al*, en 1994⁷⁹, -6,7(1,8)-.

Nachbauer CA *et al*, en 1981⁹⁶, observaron que la hiperbilirrubinemia no era debida únicamente a un fallo en la excreción de bilirrubina sino también a la hemolisis debida al hiperesplenismo secundario derivado de la hipertensión portal tras la cirrosis biliar (Ohara N *et al*, 1993⁹⁷).

V.3.1.2.3. Creatinina (CREA)

La tasa de excreción de creatinina es fundamentalmente función del filtrado glomerular. De hecho, la determinación sérica de creatinina se utiliza ampliamente como prueba clínica de la función renal.

En la presente experiencia, los niveles séricos de este metabolito no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores correspondientes de la serie de control.

Si bien, las imágenes microscópicas renales mostraban áreas de congestión vascular en las ratas sacrificadas, a la vista de los resultados bioquímicos, esto no impedía que los niveles séricos de CREA se mantuvieran dentro de los límites normales.

Por otro lado, la presencia de áreas de necrosis tubular en las ratas sacrificadas no afectó funcionalmente al riñón. Esta morfología no tuvo efecto funcional, ya que la superficie renal sana -aunque congestiva-, era suficiente para conservar el aclaramiento plasmático de metabolitos como la CREA.

Pese a la relación existente entre la insuficiencia hepática y la renal (Prieto JV, 1978¹¹⁵; Nachbauer CA *et al*, en 1981⁹⁶), este extremo no se ha puesto de manifiesto en el presente estudio.

V.3.1.2.6. Urea (UREA)

Una parte importante de los aminoácidos que alcanzan el hígado -procedentes de las proteínas de la dieta, de las proteínas endógenas, más los sintetizados directamente por el hígado- se catabolizan en urea -ciclo de la urea- y otra parte se utiliza en la síntesis de proteínas plasmáticas e intracelulares hepáticas y en otros productos -glutacion, glutamina, taurina y creatinina- (Pons F, 1997¹⁰⁰).

En el presente estudio se produce un decremento de UREA a la semana de la ligadura, que remite hasta los valores normales en las semanas siguientes. Así se mantiene hasta la 5ª semana en la que se aprecia un aumento de su concentración sérica, que en la 6ª retorna nuevamente a concentraciones normales.

La síntesis -catabolismo hepático de aminoácidos- y la eliminación -mayoritariamente renal- de UREA van a ser los factores determinantes de sus niveles sanguíneos.

Lee E *et al*, en 1972¹⁰⁹, encontraron que después de ligar el colédoco en rata se producía un descenso de la síntesis de urea del 41%, coincidente plenamente con el obtenido en el presente trabajo -41,2%- . Sin embargo los citados autores afirmaron que dicha capacidad sintética estaba disminuida durante las 7 semanas de duración de su experiencia, lo que no coincide con lo hallado en el actual estudio. En 1979, Zimmerman HJ *et al*¹¹⁷ comprobaron que con la aparición del proceso patológico cirrótico se producía un aumento de la síntesis hepática de la ornitina carbamil transferasa, íntimamente comprometida en la síntesis de urea.

El incremento de la anterior actividad enzimática en la hepatopatía cirrótica

podría ser responsable del incremento de UREA habido en el suero, que alcanzaría el máximo en la 5ª semana de colestasis. Se descarta *a priori* que los niveles de este metabolito dependan de su aclaramiento renal, dado que esta función se mantiene, como lo evidencia la concentración conservada de CREA sérica.

La uremia correspondiente a la última semana coincide con los valores estimados como normales. La explicación está en el avance de la lesión hepática en cuanto a gravedad, lo que implica la utilización de los aminoácidos de forma deficiente –desaminación oxidativa y transaminación– para liberar finalmente UREA (Pons F, 1997¹⁰⁰).

En definitiva, la concentración sérica de este metabolito está en función de su síntesis y degradación hepáticas, y no de su eliminación renal.

V.3.1.2.7. Glucosa (GLU)

El hígado es el órgano responsable de la estabilidad de la concentración sérica de glucosa, para garantizar su suministro a todo el organismo; los hepatocitos son los responsables de la síntesis, almacenamiento y catabolismo del glucógeno a partir de la glucosa.

En la cirrosis humana es frecuente la alteración de la homeostasia de la glucosa (Pons F, 1997¹⁰⁰), igual que sucede en distintos modelos de cirrosis experimental animal (Krähenbühl S *et al*, 1993¹¹⁸).

La hipoglucemia no es una característica típica de la cirrosis en general (Nachbauer CA *et al*, 1981⁹⁶), pero sí lo es de los procesos que cursan con insuficiencia hepática crónica (Prieto JV, 1978¹¹⁵) y de la cirrosis biliar (Zimmerman HJ, 1979¹¹⁷).

En el presente trabajo se manifiesta dicha hipoglucemia desde la primera semana de ligadura del colédoco. La responsabilidad de la acción quirúrgica sobre el decremento de este metabolito se estima en el 79% –coeficiente η^2 –.

Krähenbühl S *et al*, en 1991¹¹⁹, observaron igualmente el decremento de glucosa en animales cirróticos, cuando el agente desencadenante de este proceso patológico era el tetracloruro de carbono.

La causa de esta hipoglucemia fue descrita por Lee E *et al*, en 1972¹⁰⁹. Encontraron que la ligadura del colédoco en la rata ejerce un efecto depresivo sobre la síntesis hepática de la glucosa; se reduce el tanto por ciento de síntesis del metabolito a un 37% respecto a un grupo de control –24% según Krähenbühl S *et al*, en 1993¹¹⁸–, lo que ocurre a la semana de haber efectuado dicha intervención. Krähenbühl S *et al*, en 1993¹¹⁸, afirman que el descenso de la glucemia es consecuencia de una disminución de la glucogenólisis, secundaria a una disminución del almacenamiento de glucógeno. Otros autores responsabilizan del decremento de glucosa sérica al descenso de la masa hepatocelular, a la destrucción de los depósitos de glucógeno y a la incapacidad de sintetizarlo. Todo ello provoca la incapacidad hepática para el mantenimiento de la glucemia fisiológica (Pons F, 1997¹⁰⁰).

V.3.1.2.8. Lípidos séricos: colesterol (CHOL) y triglicéridos (TRIG)

El hígado, a partir de los ácidos grasos libres del plasma y de los hidratos de carbono sintetiza los TRIG y a partir del acetato sintetiza el CHOL. Parte de éste pasa a la bilis para transformarse en sales biliares y, por otro lado, se incorpora a la sangre formando parte de la fracción apolipoprotéica.

El colesterol, precursor de las sales biliares y de hormonas esteroideas, forma parte de todas las membranas celulares. Los hepatocitos sintetizan la mayor parte de este metabolito a partir del acetato, seguidos por las células intestinales. Se encarga de

controlar la síntesis la enzima hepática 3-hidroxi-3-metiltransferasa-CoA-reductasa. Esta actividad enzimática es dependiente de la cantidad de CHOL que llega al hígado desde el intestino –circulación enterohepática–, así como del CHOL endógeno. La absorción de CHOL intestinal depende de la presencia de sales biliares en el intestino, las que controlan a su vez la síntesis de este metabolito.

En el estudio, objeto de esta presentación, la concentración sérica de CHOL no sufrió variaciones significativas durante el periodo experimental. No se encontró ningún grupo cuyas medias difirieran significativamente de las de otros. Lo mismo ocurrió con la trigliceridemia.

Se esperaba un incremento inicial de estos metabolitos –debido a la suma del “pool” orgánico y al no excretado por bilis–, que quizá se produjese en un periodo anterior a la primera semana. Este aspecto está apoyado por los resultados obtenidos por Schaffner F *et al*, en 1971¹⁰⁴, quienes observaron un máximo de colesterol sérico al 2º día de ligadura del colédoco en rata y que 2 días más tarde aparecía reducido, para alcanzar, más tarde, concentraciones normales.

El descenso que posteriormente manifestaron estos parámetros se relaciona con un defecto en la capacidad biosintética hepática (Ginés P *et al*, 1996¹¹⁴).

V.3.1.2.9. Ácido úrico (UA)

La síntesis de ácido úrico corre a cargo del hígado conformando un producto de deshecho procedente del metabolismo de los aminoácidos por la vía de las purinas; su concentración sérica depende del aclaramiento renal.

En el presente estudio, la uricemia, durante las 6 semanas que duró el mismo, no mostró diferencias significativas respecto a los valores correspondientes al grupo de control. Esta circunstancia era de esperar puesto que la funcionalidad renal se mantiene, como se ha descrito más arriba.

Lee E *et al*, en 1972¹⁰⁹, observaron igualmente como tras la ligadura del colédoco en ratas la concentración sérica de UA no se modifica, lo que coincide con los resultados del actual estudio.

V.3.1.3. Constantes iónicas

V.3.1.3.1. Calcio (Ca^{++})

En el presente trabajo no se observan alteraciones de la calcemia.

A priori, la ligadura del colédoco podría afectar a la concentración del calcio sérico en la medida en que penetra en el organismo a través de la absorción intestinal. Parte de este ión es revertido al intestino a través de la propia bilis. Pero, pese a esta circunstancia, no se produce su incremento sérico. Ello se debe: por una parte, a la función eliminadora que ejerce el páncreas liberando pequeñas cantidades en el intestino; y por la otra a la propia acción intestinal.

Pero realmente el papel fundamental en la homeostasia del calcio plasmático lo tienen las hormonas parathormona y calcitonina. La primera provoca el incremento de sus niveles sanguíneos, mientras que la segunda es la responsable de su eliminación. Ambas hormonas son independientes del hígado, tanto respecto a su síntesis como a su funcionalidad.

V.3.1.3.2. Hierro (Fe^{n+})

La sideremia se mostró alterada durante la experiencia, aunque siempre dentro de los límites de la normalidad.

El déficit de hierro es común en la cirrosis, debido a episodios de hemorragias digestivas (Vargas V, 1997³). Sin embargo las hemorragias digestivas encontradas en el

actual estudio tuvieron escasa incidencia.

La hiposideremia encontrada después de 1 semana de ligadura del colédoco, – responsable de la variación global experimentada por este ión–, coincidió en el tiempo con la presencia de derrames hemáticos en la cavidad peritoneal, de gran intensidad y exclusivos de este periodo de tiempo.

V.3.1.3.3. Sodio (Na^+)

La ligadura del colédoco en rata provoca un descenso de los niveles séricos de sodio –hiponatremia–. La intensidad de la relación entre el tiempo de colestasis y la natremia se cifra en un 79,6% –coeficiente η^2 –.

El decremento de este parámetro se produce desde la 1ª semana de colestasis, estabilizándose en la 3ª semana, valores que sostiene hasta el final del periodo experimental.

La hiponatremia es común en los procesos cirróticos. Se considera como una manifestación de la retención de agua y no como una pérdida de sodio (Zimmerman HJ, 1979¹¹⁷; Vargas V, 1997³). La manifestación principal de esta retención de sodio es la ascitis –frecuente en los procesos cirróticos–, y presente en el actual estudio.

El hecho de que en las cirrosis compensadas no se produzca dicha hiponatremia y en las descompensadas sí, apoya la teoría de que es la ascitis la responsable de la retención de sodio.

V.3.1.3.4. Potasio (K^+)

Pese a presentarse alteraciones de este ión durante la colestasis, se situaron siempre dentro del intervalo normal correspondiente a la serie de control.

V.3.1.4. Alteraciones hematológicas

V.3.1.4.1. Actividad o tiempo de protrombina (TP)

La protrombina –precursor inactivo de una enzima proteolítica activa, la trombina– se sintetiza en el hígado.

Esta determinación analítica es muy sensible a las variaciones de la función hepática.

La actividad de protrombina, o tiempo de protrombina, depende de la concentración plasmática de protrombina, pero también de otros factores de la coagulación sintetizados por el hígado, tales como los factores V, VII, IX y X, y el fibrinógeno (factor I). La actividad de protrombina mide la rapidez de conversión de la protrombina en trombina, en presencia de tromboplastina y calcio.

El tiempo de protrombina permite evaluar la función de la síntesis proteica de los hepatocitos. Dado que la vida media de los factores de coagulación en el plasma es inferior a las 24 horas, constituye un índice muy sensible para detectar cambios rápidos de la función hepatocelular, incluso en hepatopatías agudas (Rodríguez DB *et al*, 1996¹⁰²).

Durante las 6 semanas del presente estudio esta actividad se halla disminuida, es decir, la rapidez con que la protrombina pasa a trombina es menor respecto a la del patrón normal. Este descenso puede ser debido a una síntesis inadecuada de los factores de coagulación por insuficiencia hepática o al déficit de vitamina K por absorción insuficiente (Pons F, 1997¹⁰⁰). Respecto a la absorción de vitamina K es importante reseñar que no se absorbe si no existe bilis.

Dado que los factores de coagulación tienen una vida corta, el tiempo de protrombina es un indicador precoz de lesión parenquimatosa grave.

V.3.1.4.2. Valor hematocrito (Hto)

Se produjo un descenso del hematocrito durante toda la experiencia. El grado de relación entre el tiempo de colestasis y el decremento del Hto se sitúa en el 80%; es decir, que la colestasis puede explicar el 80% de dicha variación.

La explicación a este descenso se encuentra en 2 realidades: la presencia de hemorragias, de diversa etiología y ubicación, –de escasa incidencia– y el hiperesplenismo, que provoca un descenso de los hematíes –hiperhemocateresis– y hemólisis –en estadios avanzados de la hepatopatía–(Vargas V,1997³).

VI. CONCLUSIONES

Supervivencia

- La ligadura y sección del colédoco en rata durante 152 días provoca un 87% de muertes (87 de los 100 casos).
- La supervivencia del presente modelo experimental –13%– se debería al restablecimiento del flujo biliar, por la presencia de colaterales. Su génesis ofrece una línea de investigación muy interesante.

Alteraciones morfológicas

- La ligadura y sección del colédoco de la rata desencadena una cirrosis biliar secundaria a partir de los 22 días de colestasis
- Este modelo experimental origina daños histológicos sobre pulmones y bazo. Se mantiene la arquitectura renal general.

Alteraciones funcionales

- La colestasis crónica provoca un descenso significativo de síntesis de las proteínas de origen hepático –albúmina y protrombina–.
- Permanece la capacidad de síntesis de triglicéridos y colesterol.
- Se alteran los mecanismos hepáticos que contribuyen a la homeostasia de la glucemia.
- La modificación de las actividades enzimáticas séricas coinciden con las del síndrome colestásico en el hombre (incremento de la fosfatasa alcalina y la glutámico pirúvico transaminasa)
- La ligadura y sección del colédoco provoca un cuadro de ictericia obstructiva, permaneciendo la capacidad hepática para conjugar la bilirrubina, lo que permite su excreción renal.
- No se manifiesta el síndrome hepatorenal en el que se ve alterada la función renal.
- Se produce la activación generalizada del sistema inmunitario (elevación significativa de las inmunoglobulinas y proliferación de las células de von Kupffer).
- La ligadura y sección del colédoco origina hiponatremia que se manifiesta por la retención de agua, en forma de ascitis –cirrosis descompensada–.
- Se produce hipertensión portal, lo que provoca hiperesplenismo y, consecuentemente, un aumento de la hemocateresis y de la hemolisis, que junto a la presencia de hemorragias de diversa etiología, determina un descenso del valor hematocrito.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Terris M. Epidemiology of cirrhosis of the liver: national mortality data. *Amer J Public Healt* 1967; 57: 2076.
2. Galambos JT. Cirrhosis. Philadelphia WB Saunders 1979; 92.
3. Vargas V. Cirrosis hepática. Barcelona: Ed. Masson S.A., 1997. Medicina interna.
4. Selbach WK. Epidemiology of alcoholic liver disease. *Prog Liver Dis* 1975; 5: 494-515.
5. Hallen J, Krook H. Follow-up studies on an unselected ten-year material of 360 patients with cirrhosis in one community. *Acta Medica Escandinavica* 1963; 173: 479-493.
6. Ginés P, Quintero E, Arroyo V y cols. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 1987; 7: 122-128.
7. Serra MA, Diago M, Guix J y cols. Valor pronóstico a corto plazo de los parámetros clínicos y de funcionalismo hepático en pacientes con cirrosis. *Gastroenterología y hepatología* 1982; 5: 316-332.
8. Damico G, Morabito A, Plagliaro L, Marubini E. Survival and prognostic indicators in compensated and descompensated cirrhosis. *Digest Dis Scien* 1986; 31: 468-475.
9. Sheldon W, Crawford M. The laboratory rat. Tomo I, Biology and diseases. New York: academic press 82-83. 1979.
10. Testud L, Latarjet A. Tratado de anatomía humana, tomo IV. Barcelona: Salvat ediciones, 1988.
11. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy of the laboratory rat. Baltimore: Williams and Wilkins, 1976.
12. Farreras, Rozman. Medicina Interna. 3ª edición en CD-ROM, 1996; 383-390.
13. Van Eyken P, Desmer V. Disordered embryogenesis of the hepatobiliary tract. En: Prieto J, Schafritz DA, (eds). *Hepatobiliary diseases*. Berlin, 1992; 931-970.
14. Conn HO, Atterbury CE. Cirrhosis in diseases of the liver. Schiff and E, Schiff J,B (eds). Philadelphia: Lipincott Company, 1987; 725-864.
15. Popper H, Orr W. Current concepts in cirrhosis. *Scand J Gastroenterol (Suppl)* 1970; 6: 203-222.
16. Anthony PP, Ishak KG, Nayac NC. The morphology of cirrhosis. *J Clin Pathol* 1978; 31: 395- 414.
17. Ludeña de la Cruz MD. Cirrosis hepática. Barcelona: Salvat Editores. Fariña J, 1990: 634-635.
18. Stanley LR, Vinay K. Hígado, vías biliares y páncreas. 4ª ed. Méjico: Interamericana, 1990: 594.
19. Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Liver biopsy interpretation. London: Ed.W.B. Saunders, 1994; 27-34.
20. Cameron GR, Karunaratne WAE. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J Pathol Bacteriol* 1936; 42: 1-21.
21. Nakamura N, Fusamoto H, Koizumi T. The effects of aminoacetonitrile and its derivate on components of hepatic connective tissue in rats with chronic hepatic injury. *Acta Hepatogastroenterol* 1975; 22: 78-84.
22. Igarashi S, Hatahara T, Nagai Y *et al.* Anti-fibrotic effects of malotilate on liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Jpn J Exp Med* 1986; 56: 235-245.
23. Rojkind M, Dunn MA. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology* 1979; 76: 849-863.
24. López-Novoa JM, Martínez-Maldonado M. Impaired renal response to splachnic

- infusion of hypertonic saline in conscious rats. *Am J Physiol* 1982; 242: F390-F394.
25. Rubin E, Hutterer F, Popper H. Cell proliferation and fiber formation in chronic carbon tetrachloride intoxication. *Am J Pathol* 1963; 42: 715-728.
 26. Recknagel RO, Ghoshal AK. Quantitative estimation of peroxidative degeneration of rat liver microsomal and mitochondrial lipids after carbon tetrachloride poisonig. *Exp Mol Pathol* 1966; 5: 413-426.
 27. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; 83: 1183-1190.
 28. Madden JW, Gertman PM, Peacock EE. Dimethylnitrosamine induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease. *Surgery* 1970; 68: 260-268.
 29. Zimmerman T, Muller A, Macknik G *et al.* Biochemical and morphological studies on production and regresion of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje:Wist rats. *Z Versuchstierd* 1987; 30: 165-180.
 30. Lieber CS, Jones DP, Mendelson J, DeCarli LM, Fatty liver. Hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption, despite adequate dietary intake. *Trans Assoc Am Physicians* 1963; 76: 289-300.
 31. Tsukamoto H, Reidelberger RD, French SW, Largman C. Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat. *Am J Pathol* 1984; 247: R595-R599.
 32. Tsukamoto H, French SW, Benson N *et al.* Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. *Hepatology* 1985; 5: 224-232.
 33. Blumberg H, McCollum EV. The prevention by choline of liver cirrhosis in rats on high fat low protein diets. *Science* 1941; 93: 598.
 34. Rubin E, Hutterer F. Methods in the study of structural changes induced by experimental chronic hepatic injury. *Methods Achiev Exp Pathol* 1967; 2: 224-242.
 35. Paronetto F, Popper H. Aggravation of hepatic lesions in mice by in vivo localization of immune complexes (Auer hepatitis). *Am J Pathol* 1965; 47: 549-563.
 36. Paronetto F, Popper H. Chronic liver injury induced by immunologic reaction. *Am J Pathol* 1966; 49: 1087-1101.
 37. Wahl SM, Hunt DA, Allen JB *et al.* Bacterial cell wall-induced hepatic granulomas. An in vivo model of T cell-dependent fibrosis. *J Exp Med* 1986; 163: 884-902.
 38. Leach BE, Fobes JC. Sulfonamide drugs as protective agents against carbon tetrachloride poisoning. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 48: 361-363.
 39. Ledue EH. Sulfaguandine protection of muose liver from carbon tetrachloride-induced necrosis. *Lab Invest* 1973; 29: 186-196.
 40. Fujimoto M, Kimoto M, Sugarawa I *et al.* Immunological study of homozygous rhino mice associated with spontaneously occurring hepatic fibrosis. En: Hirayama C, Kivirikko KL (Eds). *Pathobiology of hepatic fibrosis*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1985; 171-180.
 41. Brodie B. On the effects produced by the bile in the process of digestion. *Quart.J.Sci.* 1823; 14: 341-346.
 42. Trams EG, Symenonidis. Morphological and functional changes in the livers of rats after ligation and excision of the common bile duct. *Am J Pathol* 1957; 33: 13-27.
 43. Legg JW. On the changes in the liver which follow ligature of the bile ducts. *St Bart's Hosp.Rep* 1873; 9: 161-181.
 44. Charcot LM, Gombault A. Note sur les alterations du foie consècutives à la ligature du canal cholédoque. *Arch Physiol norm path* 1876; 3: 272-299.

45. Foà P; Salviolo G. *Richerche anatomiche e sperimentali sulla patologia del fegato. Parte seconda.* Arch Sci med 1877; 3: 1-50.
46. Cameron GR, Oakley CL. Ligation of the comun bile duct. J Pathol Bact 1932; 35: 796-798.
47. Cameron GR, Hassan SM. Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. J Phathol Bact 1958; 75: 333-394.
48. Mc Donald RA, Pechet G. Liver cell regeneration due to biliary obstruction. Archs Path 1961; 72: 133-141.
49. Carter M. Alternative pathways of bilirrubin metabolism. PhD thesis. London University 1966.
50. Moritz M, Snodgrass PJ. Serum enzymes derived from liver cell fractions. II Response to bile duct ligation in rats. Gastroenterology 1972; 62: 93-100.
51. Johnstone JMS, Lee EG. A quantitative assessment of structural changes in the rats liver following obstruction of the common bile duct. Br J Exp Pathol 1976; 57: 85-94.
52. Franco D, Gigon M, Szekely AM, Bismuth H. Portal hypertension after bile duct obstruction. Effect of bile diversion on portal pressure in the rat. Ar Dis Surg 1979; 114: 1064-1067.
53. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction; new experimental model for cirrhosis in the rat. Br J Exp Pathol 1984; 65: 305-311.
54. Kraus GE, Beltran A. Arch Surg 1959; 79: 769.
55. Wright JE, Braithwaite JL. Collateral biliary channels. Nature 1962; 195: 95-96.
56. Wright JE, Braithwaite JL. The effects of ligation of the common bile duct in the rat. J Anat Lond 1964; 98(2): 227-233.
57. Muriel P, Suarez OR, González P, Zúñiga L. Protective effect of S-adenosyl-1-methionine on liver damage induced by biliary obstruction in rats: a histological, ultraestructural and biochemical approach. J Hepatol 1994; 21: 95-102.
58. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 1978; 24: 58-73.
59. Szasz G. Reaction rate method for gamma-glutamyl transferase activity in serum. Clin Chem 1976; 22: 2051-2055.
60. Richards AH, Lubinski RM, Vanderlinde RE. Clin Chem 1975; 21: 1018.
61. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia PA: WB Saunders Co. 1986; 710.
62. Dumas BT, Waston WA, Biggs HG. Albumin standartds and measurement of serum albumin with bromcresol green. Clin Chim Acta 1971; 31: 87-96.
63. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem 1949; 177: 751-766.
64. Department of Health. Education and Welfare. Food and Drug Administration. Proposed establishment of product class standart for detection or measurement of glucose. Fed Regis 1974; 39(126): 24136-24147.
65. Talke H, Schubert GE. Klin Wchenschr 1965; 43: 174.
66. Rossingnol B, Rossignol D, Petitclerc C. Improvement of creatinine measurement on RA-1000. Clin Biochem 1984; 17(3): 203-204.
67. Trinder P. J Clin Pathol 1969; 22: 158-161.
68. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 1974; 20: 470.
69. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that prduces hydrogen peroxide. Clin Chem 1982; 28(10): 2077.

70. Van der Bergh AAH, Muller P. Über eine directe und eine indirecte diazoreaktion auf bilirubin. *Biochem* 1986; Z 77: 90-103.
71. Giltelman HJ. An improved automated procedure for the determination of calcium in biochemical specimens. *Anal Biochem* 1967; 18: 521-531.
72. Artiss JD, Strandbergh DR, Zac B. Study of continuous flow automation for serum iron on comparing several sensitive reagents. *Microchemical J* 1983; 28: 275-284.
73. Eisenman G. Glas electrodes for hydrogen and other cations. Principles and practice. New York: Marcel Dekker Inc, 1967; 2.
74. Berkson J, Gage RR. Calculation of survival rates for cancer. *Proceeding of staff meetings. Mayo Clinic* 1950; 25: 270-286.
75. Cutler SJ, Ederer F. Maximun utilization of the life tables method in analyzing survival. *Journal of chronic diseases* 1958; 8: 699-712.
76. Fisher RA. Statistical methods for research workers (1925). New York. Hafner Publishing Co. Edición 1970.
77. Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis?. *Hepatology* 1983; 3: 112-120.
78. Castro e Silva O, Mazzetto SA, Santos JS, Ceneviva R, Zucoloto S. Experimental induction of secondary biliary cirrhosis in rats. A new surgical procedure. *Research in surgery* 1995; 7(1): 42-44.
79. Zimmerman H, Blaser H, Zimmerman A, Reichen J. Effect of development on the functional and histological changes induced by bile-duct ligation in the rat. *J Hepatol* 1994; 20: 231-239.
80. Marinelli A, Sánchez A, Izquierdo F, Burgos F, Arce A. Cambios morfológicos pre y postderivación biliodigestiva en cirrosis experimental por ligadura de vía biliar en rata. *Rev Esp Enf Digest* 1995; 87(1): 25-31.
81. Weinbren K. The effect of bile duct obstruction on regeneration of rat's liver. *Brit J Exp Path* 1953; 34: 280-289.
82. Cameron GR, Prasad LBM. Recovery from biliary obstruction after spontaneous restoration of the obstructed common bile duct. *J Path Bact* 1960; 80: 127-136.
83. Steiner PE, Bariz JM. Effects on the rat liver of bile duct, portal vein and hepatic artery ligations. *Amer J Path* 1961; 39: 13-28.
84. Owen J, Copper N. Metabolism after biliary fistula obstruction or sham operation in rats. *Mayo Clinic Proc* 1975; 50: 412-415.
85. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Seminars in liver disease* 1990; 10(1): 56-66.
86. Ni Y, Lukito G, Marchal G, Cresens E, Yu J, Petré C, Baert AL, Fevery J. Potential role of bile duct collaterals in the recovery of the biliary obstruction: experimental study in rats using microcholangiography, histology, serology and magnetic resonance imaging. *Hepatology* 1994; 20(6): 1557-1566.
87. Gulik TM, Lygidakis NJ, Marle J, James J, Klover PJ, Heyde MN. A scanning electron microscopic study of the common bile duct epithelium in the rabbit during experimental biliary tract obstruction. *Hepato-gastroenterol* 1988; 35: 215-218.
88. Moratinos P, Gutiérrez C, Martínez T, Hernández-Gil ML. Estudio morfológico de la cirrosis hepática experimental en ratas postligadura del colédoco. *Med Mil* 1989; 45: 566-572.
89. Poulsen C. Histological changes in liver biopsies from patients with surgical bile duct disorders. *Acta Path Microbiol Scand* 1970; 78 A: 571-579.
90. Schaffner F, Popper H. Cholestasis is the result of hypoactive hypertrophic smoot

- endoplasmic reticulum in the hepatocyte. *The Lancet* 1969; 16 agosto: 355-359.
91. Martin A S, Cano AR, Suarez EG. Introducción a la colestasis. *Gastrum* 1980; septiembre: 13-34.
92. Proctor E, Chatamra K. Controlled induction of cirrhosis in the rat. *B J Exp Path* 1983; 64: 320-330.
93. Proctor E, Chatamra K. Standardized micronodular cirrhosis in the rat. *Eur Surg Res* 1984; 16: 182-186.
94. Accatino L, Contreras A, Fernández S, Quintana C. The effect of complete biliary obstruction on bile flow and bile acid excretion: postcholestatic cholestasis in the rat. *J Lab Clin Med* 1979; 93: 706-717.
95. Sherlock S. Classification and functional aspects of portal hypertension. *Am J Surg* 1974; 127: 121-128.
96. Nachbauer CA, Fischer JE. The failing liver. Symposium on liver, spleen and pancreas. *Surg Clin of North Am* 1981; 61: 221-231.
97. Ohara N, Schaffner T, Reichen J. Structure-function relationship in secondary biliary cirrhosis in the rat. Stereologic and hemodynamic characterization of a model. *J Hepatol* 1993; 17: 155-162.
98. Epstein M. El síndrome hepatorenal. *Rev Clin Esp* 1988; 183: 37-41.
99. Lier H, Jacob AI. Endotoxin and renal failure in liver disease. New York: Epstein M(ed): *The kidney in liver disease*. 1983; 535-551.
100. Pons Romero F. Fisiología clínica y enfoque diagnóstico de las enfermedades del hígado. Barcelona: Ed Masson S.A., 1997.
101. Curtis JS, Moritz M, Snodgrass PJ. Serum enzymes derived from liver cell fractions. I/ The response to carbon tetrachloride intoxication in rats. *Gastroenterology* 1972; 62: 84-92.
102. Rodríguez DB, Andreu HS. Valoración analítica de la función hepática. *Medicine* 1996; 7(11): 456-461.
103. Judah JD, Ahmed K, McLean AEM. Pathogenesis of cell necrosis. *Fed Proc* 1965; 24: 1217-1221.
104. Schaffner F, Bacchin PG, Hutterer F, Scharnbeck HH, Sarkozi LL, Denk H, Popper N. Mechanism of cholestasis. 4/ Structural and biochemical changes in the liver and serum in rats after bile duct ligation. *Gastroenterology* 1971; 60: 888-897.
105. Abbruzzese AA, Jeffery RL. Marked elevation of serum glutamic oxalacetic transaminase and lactic dehydrogenase activity in chronic extrahepatic biliary diseases. *Am J Dig Dis* 1969; 14: 332-338.
106. Simon FR, Arias IM. Alteration of bile canalicular enzymes in cholestasis. A possible cause of bile secretory failure. *J Clin Inv* 1973; 52: 765-775.
107. Balcells A. La clínica y el laboratorio. Interpretación de análisis y pruebas funcionales. 15ª edición. Barcelona: Ed. Salvat, 1989; 4: 57-193.
108. Panduro A, Shalaby F, Biempica L, Shafritz DA. Changes in albumin, α -fetoprotein and collagen gene transcription in CCl₄-induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 1988; 8(2): 259-266.
109. Lee E, Ross BD, Haines JR. The effect of experimental bile duct obstruction on critical biosynthetic functions of the liver. *Brit J Surg* 1972; 59(7): 564-568.
110. Pérez SP. Pruebas de evaluación funcional del hígado. *Gastrum* 1978; Septiembre: 90-104.
111. Hasch E, Jarnum S, Tygstrup N. Albumin synthesis rate as a measure of liver function in patients with cirrhosis. *Acta Med Scan* 1967; 183: 83-92.

112. Keyser JW. Secretory liver proteins in disease. En: Glaumann H, Peters T, Redman C, eds. Plasma protein secretion by the liver. London, Academic Press, Inc, Ltd. 1983; 456-486.
113. Birke G. Factors regulating the plasma protein levels in normal and pathological conditions. En: Peters H, (ed). Protides of the biological fluids, vol 14. Amsterdam, the Netherlands, 1966; 253-266.
114. Ginés P, Arroyo V. Cirrosis hepática. Ed. 13ª. Medicina interna. Barcelona, 1996; 337-343.
115. Prieto JV. Insuficiencia hepatocelular I y II. Gastrum 1978; Septiembre: 30-38.
116. Popper H; Schaffner F. Pathophysiology of cholestasis. Human pathol 1970; 1: 1-24.
117. Zimmerman HJ, Bernard JH. Determinaciones de las enzimas séricas como ayuda diagnóstica. En Diag Clin por el laboratorio: (ed) Salvat, 1979; 859-890.
118. Krähenbühl S, Reichen J. Decreased hepatic glucose production in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. J Hepatol 1993; 19: 64-70.
119. Krähenbühl S, Weber FL, Brass EP. Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. Hepatology 1991; 14: 1189-1195.



BIBLIOTECA